

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Kadi Ainsaar

***Pseudomonas putida* ColRS süsteem on tsingi-, raua-, mangaani- ja
kaadmiumiliiga tunnetav signaalirada**

Magistritöö

Juhendaja
PhD Rita Hõrak

TARTU 2013

Sisukord

Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1. Siirdemetallid	7
1.2. Siirdemetallide vajalikkus prokarüootidele	8
1.3. Siirdemetallide toksilisus.....	9
1.4. Siirdemetallide hulga reguleerimine	10
1.4.1. Siirdemetalle transportivad süsteemid	10
1.4.1.1. Metallioonide transport rakku	10
1.4.1.2. Metallioonide transport rakust välja	12
1.4.2. Siirdemetalle siduvate valkude hulga reguleerimine	13
1.4.3. Membraani modifitseerimine.....	14
1.4.4. Siirdemetallidega seotud kaitsemehhanismid eukarüootides	15
1.5. ColRS kahekomponentne signaalirada.....	15
2. Eksperimentaalne osa	18
2.1. Töö eesmärgid	18
2.2. Materjal ja metoodika.....	19
2.2.1. Kasutatud söötmed, bakteritüved ja plasmiidid.....	19
2.2.2. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)	19
2.2.3. Kloneerimine	20
2.2.4. Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon	22
2.2.5. DNA eraldamine ja restriksioonanalüüs	22
2.2.6. DNA sekveneerimine.....	23
2.2.7. Deletsioonmutantide konstrueerimine	23
2.2.8. <i>colS</i> -defektse tüve komplementeerimine algse või mutantse ColS'ga	23
2.2.9. Metallitundlikkuse analüüs	24
2.2.10. β -galaktosidaasi eriaktiivsuse määramine	24
2.2.11. Western blot analüüs.....	25
2.2.12. Välismembraani valkude eraldamine	26
2.2.13. Lipopolüsahhariidide eraldamine	26
2.2.14. Lipopolüsahhariidide suhte määramine	27
2.3. Tulemused	28

2.3.1. <i>P. putida</i> PaW85 <i>colR</i> - ja <i>colS</i> -defektsed tüved on tundlikud tsingi-, raua- ja mangaaniliiale	28
2.3.2. ColRS süsteemi defektsus mõjutab rohkem Fe ²⁺ kui Fe ³⁺ tundlikkust	29
2.3.3. Tsink mõjutab <i>P. putida</i> ColR-reguleeritavate geenide promootorite aktiivsust läbi ColRS signaaliraja	30
2.3.4. Tsingiliig ei muuda <i>colRS</i> operoni ekspressiooni ega ColR valgu hulka rakus	33
2.3.5. Lisaks tsingile mõjutavad ColR-reguleeritavate promootorite aktiivsust ka raud, mangaan ja kaadmium	34
2.3.6. Ükski teadaolev ColR-reguleeritav geen pole üksinda vastutav ColRS süsteemi defektsete rakkude suurema tsingitundlikkuse eest	36
2.3.7. Tsingiliia korral muutub erineva ahelapikkusega lipopolüsahhariidide suhe, aga mitte muster	38
2.3.8. <i>colR</i> -defektse tüve tsingiliias kasvanud rakkude välismembraani valguline koostis erineb algtüvest	39
2.3.9. ColS-i periplasmaatilises osas on neli konserveerunud glutamiinhapet ja üks asparagiinhape	40
2.3.10. ColS'i periplasmaatilise osa konserveerunud glutamiinhapete või asparagiinhappe asendamine ei mõjuta <i>P. putida</i> tsingitundlikkust, kuid E126 ja E129 asendus vähendab rauataluvust	41
2.4. Arutelu	44
2.4.1. Tsink, raud, mangaan ja kaadmium aktiveerivad <i>P. putida</i> PaW85 tüve ColRS signaaliraja, mis on vajalik tsingi-, raua- ja mangaaniliia talumiseks	44
2.4.2. PP0035-PP0034-PP0033 operoni deleteerimine mõjutab mõnevõrra <i>P. putida</i> tsingitaluvust	46
2.4.3. ColRS süsteem on tsingiliias vajalik välismembraani valgulise koostise muutmiseks	47
2.4.4. ColS kui metallisensor	48
2.4.5. Tsingi- ja mangaaniliig indutseerib <i>P. putida</i> 's siderofooride sünteesi	49
Kokkuvõte	51
Summary	52
Kasutatud kirjandus	54
Kasutatud veebiaadressid:	58
Lisa 1	59

Kasutatud lühendid

BCIP – 5-bromo-4-klooro-3-indolüülfosfaat (ingl. k. *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*)

EDTA – etüleen-diamiin-tetraäädikhape (ingl. k. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

HEPES – (N-2-hüdroksü-etüülpiperasiin-N'-2- etaansulfoonhape)-NaOH (ingl. k. *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)- NaOH*)

IPTG – isopropüül-β-tio-galaktopüranosiid

L-Ara4N – 4-amino-4-deoksü-L-arabinoos

LPS – lipopolüsahhariid

MIC – minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon (ingl. k. *minimal inhibitory concentration*)

NBT – nitrosinine tetrasool (ingl. k. *nitro blue tetrazolium*)

ONPG – orto-nitrofenüül-β-D-galaktopüranosiid

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat (ingl. k. *sodium dodecyl sulphate*)

SM – sisemembraan

TP – tsütoplasma

VM – välismembraan

Sissejuhatus

Mitmed metallid nagu raud ja tsink on looduses laialt levinud maavarad ja osad neist on vajalikud ka elusorganismidele. Eelkõige kasutavad organismid looduses rohkem levinud ja lihtsamini kättesaadavaid siirdemetalle nagu näiteks rauda, tsinki, mangaani, vaske, koobaltit ja niklit. Olles ensüümide kofaktoriteks või aidates säilitada valkude struktuuri, on neil metallidel oluline roll paljudes rakusisestes protsessides. Samas on kõik metallid suures koguses elusorganismidele toksilised.

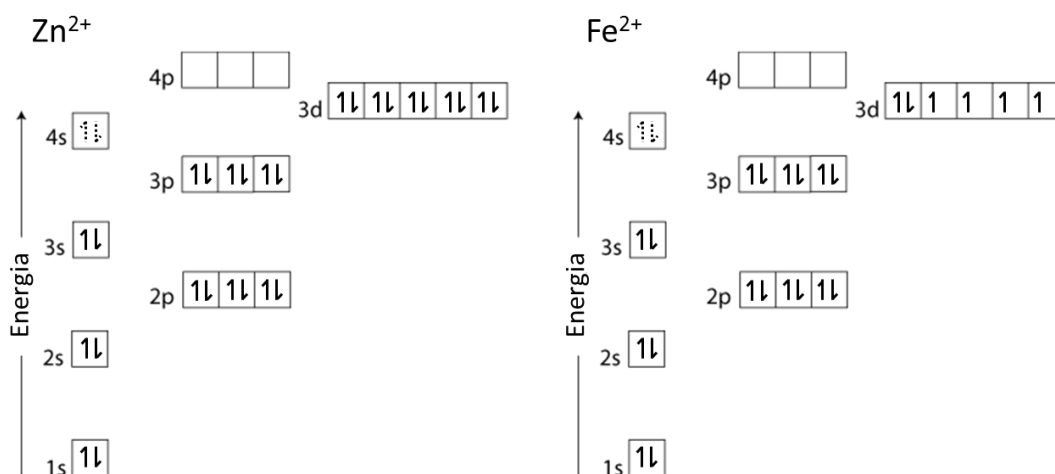
Väga erinevates elupaikades kasvavad bakterid peavad hakkama saama mitmesuguste ja muutuvate keskkonnatingimustega, sealhulgas metallide liia või vähesusega. Seetõttu reguleerivad nad nii metalliioonide importi kui eksporti, muudavad metalliioone sisaldavate valkude koguseid rakus ja modifitseerivad ka rakumembraani, et takistada liigsete metalliioonide sisenemist. Väliskeskkonna tingimuste tunnetamises ja selle vastavalt reageerimises on bakteritele olulised kahekomponentsed signaaliülekanalad. Need on kahest valgust koosnevad süsteemid, millest üks tunneb ära signaali ja vastusena sellele aktiveerib teise valgust, milleks on enamasti transkriptsioonifaktor.

Üheks kahekomponentseks signaaliülekanalaks on ka meie laboris uuritav ColRS süsteem. Pseudomonaadides konserveerunud ColRS süsteem, mis on olemas ka näiteks taimepatogeene sisaldava perekonna *Xanthomonas* liikides, on seotud mitmesuguste protsessidega. ColRS signaaliraja olemasolu on pseudomonaadidele vajalik nii taimejuurtel kasvades (Dekkers jt., 1998; Ramos-Gonzalez jt., 2005), virulentsuse tagamises (Garvis jt., 2009; Gutu jt., 2013) kui membraani terviklikkuse säilitamises (Kivistik jt., 2009; Putrinš jt., 2011). Samas ei ole seni teada, millisele signaalile ColRS süsteem reageerib. Kuna kaadmiumiresistentses *Pseudomonas putida* CD2 tüves leiti, et ColRS signaalirada on vajalik metalliiooni talumiseks (Hu ja Zhao, 2007), siis püstitati käesoleva töö eesmärgiks selgitada, kas ColRS süsteem võiks olla oluline metalliiooni tingimustes ka *P. putida* tüvele PaW85 ja kas metalliiooni võiks olla ColRS süsteemi aktiveerivaks signaaliks.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Siirdemetallid

Enamasti nimetatakse siirdemetallideks perioodilisustabeli keskmises osas, 3. kuni 12. rühmas paiknevaid elemente, kuigi definitsiooni järgi 12. rühma elemendid siirdemetallide hulka ei kuulu. Siirdemetallid on defineeritud kui elemendid, millel endal või millest moodustuval ioonil on osaliselt täidetud d alakiht. 12. rühma elementidel, tsingil, kaadmiumil ja elavhõbedal, on d alakiht elektronidega täielikult täidetud ning ka ionide moodustamisel ei anna nad ära mitte d, vaid viimase s alakihi elektrone (Joonis 1) (Jensen, 2003). Käesolevas töös kasutatakse siirdemetallide laiemat tähendust kaasates ka 12. rühma metalle. Nimetus siirdemetallid tuleneb sellest, et nendes metallides suureneb perioodilisustabelis vasakult paremale liikudes eelviimases elektronihis olevate elektronide arv kaheksast kuueteistkümneni, mistõttu on need metallid üleminekuelementideks väga reaktsioonivõimelistelt 1. ja 2. rühma metallidelt vähem reaktsioonivõimelistele poolmetallidele ja mittemetallidele. Siirdemetallide ühiseks omaduseks on viimase elektronikihi s elektronide kasutamine sidemete moodustamises, kuid sageli osalevad sidemete moodustamises ka d alakihi elektronid. Sama siirdemetall võib sidemete loomiseks kasutada erineval arvul d elektrone ja seetõttu on paljudel siirdemetallidel mitu võimalikku oksüdatsiooniastet. Lisaks on d elektronide kasutamine põhjuseks, miks erinevate siirdemetallide lahused on sõltuvalt siirdemetallist, tema oksüdatsiooniastmest ja ligandist erineva värvusega (Atkins ja Jones, 2008).



Joonis 1. Zn^{2+} ja Fe^{2+} ionide elektronide asetus elektronkihtidel. Definitsiooni järgi siirdemetallide hulka kuuluval rauaioonil on d alakiht osaliselt, tsingiioonil aga täielikult elektronidega täidetud. Elektronihid on tähistatud numbritega, alakihid tähtedega, orbitaalid ruudu või ruutude reana ja elektronid poolnooltena. Ioonist puuduvad elektronid on tähistatud katkendlike nooltega.

1.2. Siirdemetallide vajalikkus prokarüootidele

Mitmed siirdemetallid on elusorganismidele vajalikud. Kuigi eukarüoodid, prokarüoodid ja arhed kasutavad erinevaid siirdemetalle erinevates kogustes, on peamised vajaminevad siirdemetallid samad. Kõik organismid vajavad rauda ja tsinki, kuid olulised on ka mangaan, koobalt, nikkel, vask ja molübdeen. Mõned bakteriliigid kasutavad ka vanaadiumi ja volframi. Siirdemetallide põhiliseks ülesandeks rakkudes on olla ensüümide kofaktoriteks, kuid näiteks tsink on sageli vajalik ka õige valgustruktuuri säilitamiseks (Frausto da Silva ja Williams, 2001; Nies ja Grass, 2009).

Sarnaselt eukarüootidele, on ka bakterirakkudes kõige suuremas koguses rauda ja tsinki (Outten ja O'Halloran, 2001). Enamus rauast on sõltuvalt bakteriliigist kas hingamisahela, fotosünteesi või ka lämmastiku fikseerimisega seotud valkude koostises, moodustades seal Fe-S klastreid koos tsüsteiinide väävli aatomitega (Py ja Barras, 2010). Rauda sisaldavad aga ka mitmed rakusisese keskkonna tunnetamisega seotud transkriptsioonifaktorid (Kiley ja Beinert, 2003). Teine rakkudele oluline siirdemetall, tsink, on samuti paljude ensüümide kofaktor. *E. coli*'s on teada umbes sada tsinksõltuvat valku, sealhulgas DNA polümeraas I, RNA polümeraas ja tRNA süntetaasid (Flo jt., 2004; Nies ja Grass, 2009). Lisaks aitab tsink säilitada teatud valkude, nagu näiteks ribosoomivalgu RpmE, õiget struktuuri (Nanamiya jt., 2004).

Oluliseks siirdemetalliks on ka mangaan, mida kasutatakse eelkõige hapnikuradikaalide kahjutustamisel. Mitmes bakteriliigis on mangaan superoksiidi dismutaasi kofaktoriks. Superoksiidi dismutaas on ensüüm, mis katalüüsib hapnikuradikaalide muutmist H_2O_2 'ks (Horsburgh jt., 2002). On leitud, et mangaan kaitseb rakke hapnikuradikaalide eest ka superoksiidi dismutaasist sõltumatult (Tseng jt., 2001). Erinevalt näiteks rauast ei peeta mangaani rakkudele eriti ohtlikuks siirdemetalliks, sest tema affiinsus valkude tioolrühmade suhtes on väike ja ta ei tekita hapnikuradikaale (Nies ja Grass, 2009). Seetõttu arvatakse, et tsütoplasmas leidub vabu Mn^{2+} ioone, mis seonduvad valkudele nõrgalt ja mittespetsiifiliselt, varjestades ära radikaalide suhtes tundlikud kohad (Tseng jt., 2001).

Vask, nikkel ja koobalt on rakkudele vähem vajalikud. Vask kuulub teadaolevalt vaid üksikute valkude koostisesse ning mitte kõik bakteriliigid ei kasuta neid valke (Solioz jt., 2010). Näiteks *E. coli*'s on vask hingamisahelaga seotud ja arvatavasti anaeroobsetes tingimustes vajaliku ensüümi NADH dehüdrogenaas-2 kofaktoriks (Rapisarda jt., 2002). Niklit sisaldavaid valke on teada rohkem kui vaske sisaldavaid, kuid *E. coli*'s on nendest ainult kaks, hüdrogenaas ja glükosalaas I, sellised, kus niklit ei või asendada mõni teine

siirdemetall (Hausinger ja Zamble, 2007). Koobaltit siduvaid ensüüme on teada sama vähe, kui vaske siduvaid valke ning sarnaselt nikkelveikudele võidakse neis Co^{2+} asendada mõne teise metalliga (Nies ja Grass, 2009).

Molübdeen on samuti üks bakteritele vajalikest siirdemetallidest. Ta on kofaktoriks mitmesugustele ensüümidele, mis on seotud nii lämmastiku sidumise kui süsiniku- ja väävliühendite metabolismiga. Näiteks sisaldavad molübdeeni nitraadi reduktaas, dimetüülsulfoksiidi reduktaas ja CO dehüdrogenaas (Hänzelmann ja Meyer, 1998; McNicholas ja Gunsalus, 2002). Levinud arvamuse kohaselt oli aga algselt, enne hapnikurikka atmosfääri tekkimist, kui keskkond oli redutseerivam, levinumaks metalliks valkudes volfram ning hiljem, seoses lahustunud molübdeeni hulga suuremisega, on volfram asendatud molübdeeni (Kletzin ja Adams, 1996). Tänapäeval leidub volframi sisaldavaid ensüüme vaid üksikutes anaeroobsetes tingimustes kasvavates merebakterites ning need ensüümid on seotud mõnede süsinikuühendite metabolismiga (Roy ja Adams, 2002).

Kõik organismidele vajalikud siirdemetallid, tsink, mangaan, raud, koobalt, nikkel, vask ning molübdeen, on lihtsasti kättesaadavad (Frausto da Silva ja Williams, 2001). Esiteks leidub neid siirdemetalle maakoos suures koguses. Raud on maakoos kõige levinum siirdemetall ja molübdeen peamistest vajalikest siirdemetallidest kõige vähem levinum, olles siiski leiduvuselt 14. kohal (www.science.co.il). Teiseks püsivad nende metallide, välja arvatud raua, ioonid vees lahustunult, sest nad esinevad vees madala, $+2$, oksüdatsiooniastmega ioonidena. Mida madalam on elemendi oksüdatsiooniaste, seda raskem on teda redutseerida ja seda vähem tõenäoliselt moodustub vastava metalli hüdroksiid. Kuna kõikide siirdemetallide hüdroksiidid on vees lahustumatud, siis sadenevad suurema oksüdatsiooniastmega ioonid veest välja (Atkins ja Jones, 2008; Frausto da Silva ja Williams, 2001).

1.3. Siirdemetallide toksilisus

Kõik siirdemetallid, ka need, mis on vajalikud, on rakkudele suures koguses toksilised. Sageli on siirdemetallide toksilisus põhjustatud sellest, et liias olev metall konkureerib teised siirdemetallid valkudest välja. Siirdemetallide võime moodustada sidemeid valkude tiol- ja hüdroksüülrühmadega on erinev ja seda iseloomustab Irving-Williamsi rida – $\text{Mn}^{2+} < \text{Fe}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ (Irving ja Williams, 1953). Seega on vask võimeline kõiki teisi siirdemetalle valkudest välja tõrjuma, samas kui raud suudab konkureerida vaid mangaaniga. Tsingi üheks toksilisuse põhjuseks peetakse seondumist hingamisahelas osalevate valkudega, mis vajavad rauda, et elektronide transpordiahel töötaks (Lee jt., 2005; Nies, 2007). Teiseks

siirdemetallide toksilisuse põhjuseks on osade nende võime tekitada hapniku- ja hüdroksüülradikaale. Liigne raud on toksiline, sest Fe^{2+} ionide vahendusel tekivad H_2O_2 lagunemisel reaktiivsed hüdroksüülradikaalid, mis kahjustavad nii valke, lipiide kui DNA'd (Touati, 2000). Sarnaselt rauale tekitab ka liigne vask vabu radikaale (Solioz jt., 2010).

1.4. Siirdemetallide hulga reguleerimine

Kuna siirdemetallid on rakkudele vajalikud, kuid suures koguses toksilised, siis on bakteritele oluline, et rakusisesed metalliioonide kogused hoitaks kindlates vahemikes. Siirdemetallide hulka reguleeritakse nii metalliioonide sisse- kui väljatranspordiga, kuid metallide liia või vähesusega hakkama saamiseks muudetakse ka metalle siduvate valkude koguseid ja membraani valgulist ning lipopolüsahhariidset koostist (Kato jt., 2012; Nies ja Grass, 2009).

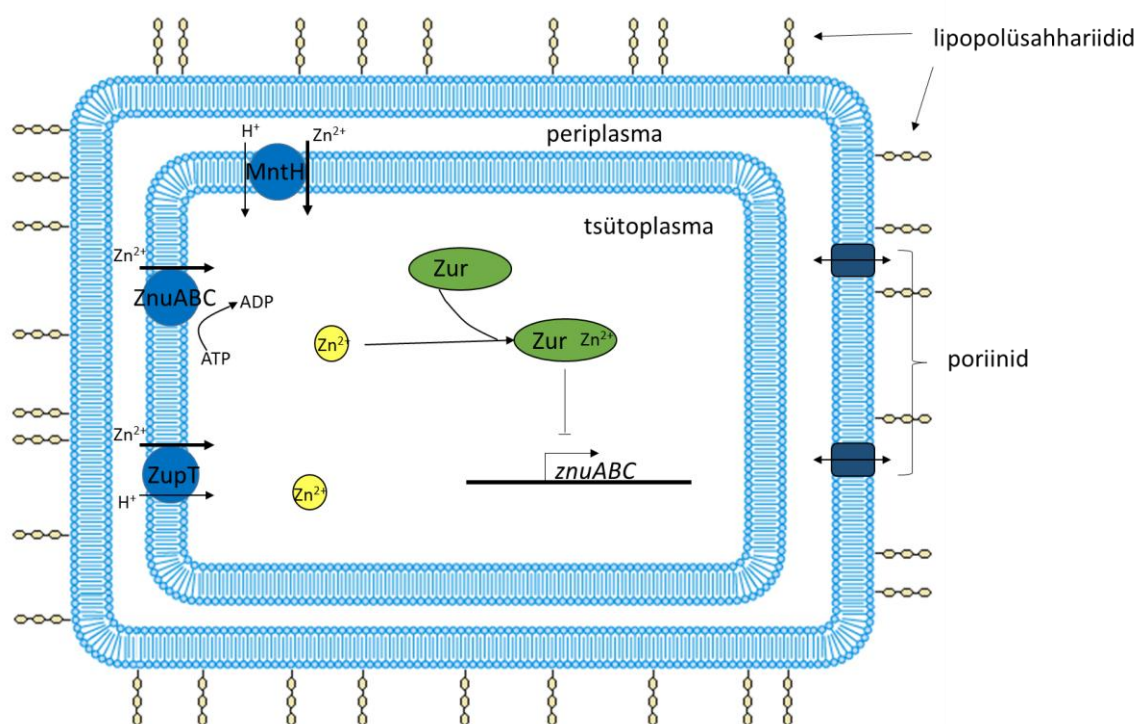
1.4.1. Siirdemetalle transportivad süsteemid

Üheks võimaluseks, kuidas bakterid saavad rakusisest siirdemetallide kontsentratsiooni mõjutada, on reguleerides nende ionide sisse- ja väljatransporti. Kuna metalliioonid ei difundeeru ise läbi lipiidse rakumembraani, siis vahendavad nende transporti valgulised kompleksid (Nies, 2007).

1.4.1.1. Metalliooniõnide transport rakku

Kui Fe^{3+} ioonid välja arvata, siis on bakteritel metalliioonide sissetransportimiseks kahte tüüpi transpordisüsteeme: madala spetsiifilisusega süsteemid, mis enamasti kasutavad metalliioonide transpordiks mingite teiste molekulide gradienti, ja kõrge spetsiifilisusega süsteemid, mis kasutavad ATP energiat. Tavalises olukorras kasutatakse vajalike siirdemetallide kättesaamiseks eelkõige madala spetsiifilisusega süsteeme. Kui aga mingit kindlat metalli on rakus väga vähe, siis võetakse kasutusele kõrge spetsiifilisusega transpordisüsteemid (Blencowe ja Morby, 2003). Näiteks kasutab *E. coli* tsingi rakku transportimiseks MntH ja ZupT transportereid ning vajadusel ka kõrge spetsiifilisusega ZnuABC süsteemi. *E. coli* on gramnegatiivne bakter ning need süsteemid asuvad tema sisemembraanis, transportides ioone periplasmast tsütoplasmasse (Joonis 2). Periplasmasse pääsevad metalliioonid läbi välismembraani valguliste kanalite – poriinide (Nikaido, 2003). Periplasmast siirdemetalle edasi transportiv MntH süsteem on prootonsõltuv Mn^{2+} transporter,

mis lisaks mangaanile transpordib ka Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} ja väiksemas koguses Ni^{2+} ning Cu^{2+} ioone (Makui jt., 2000). Teine madala spetsiifilisusega süsteem, ZupT, transpordib Zn^{2+} , Fe^{2+} ja Co^{2+} , kuid tõenäoliselt ka Mn^{2+} ja Cd^{2+} ioone (Grass jt., 2005). Rakusisest tsingi hulka tunnetab Zur regulaatorvalk, millel on kaks Zn^{2+} seondumiskohta ja mis tsingiga seondunult on mitmete geenide, sealhulgas ZnuABC transporterit kodeeriva operoni, repressoriks (Joonis 2). Seega, kui rakusisese tsingi hulk väheneb, hakatakse sünteesima ZnuABC süsteemi, mis transpordib raku ainult tsingioone, kasutades selleks ATP energiat (Outten jt., 2001; Patzer ja Hantke, 1998).



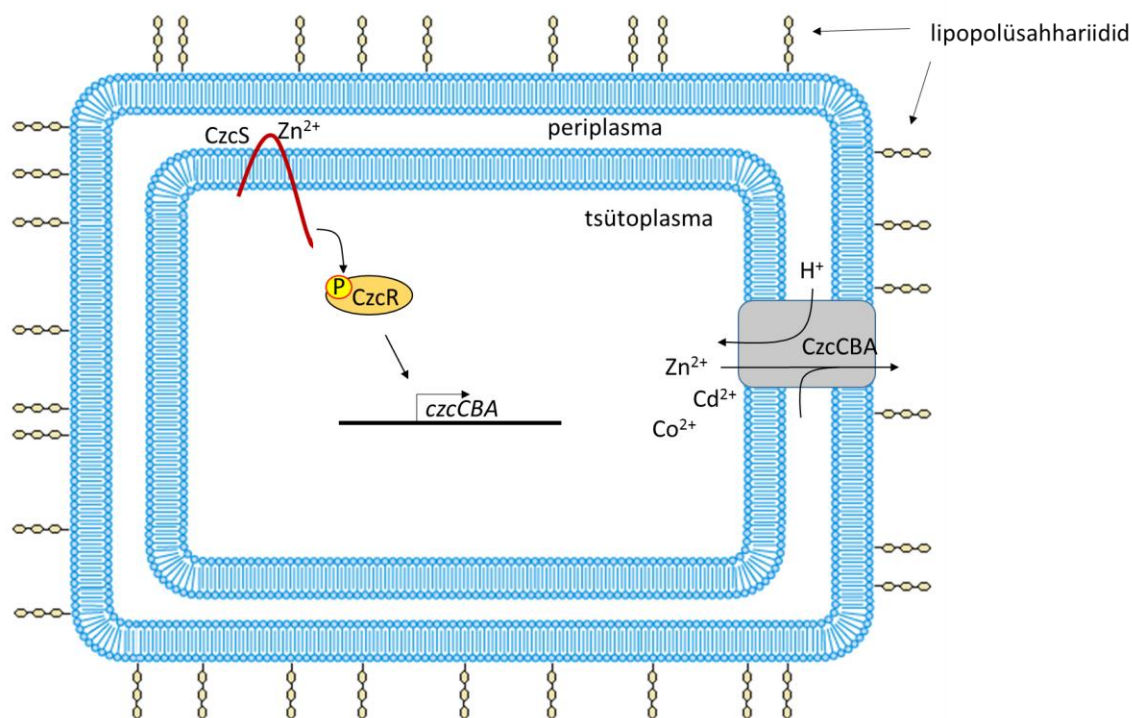
Joonis 2. Zn^{2+} import *E. coli* raku. Zn^{2+} ioonid pääsevad läbi poriinide periplasmasse, kust nad transporditakse MntH, ZupT ja ZnuABC transporterite abil tsütoplasmasse. ZnuABC kompleksi kodeeriva operoni ekspressiooni reguleerib Zur regulaatorvalk, mis tsingiga seondunult on *znuABC* geenide repressoriks. Joonis muudetud (Cui jt., 2008) järgi.

Enamus rauast on looduses lahustumatute Fe^{3+} ühenditena ja raua kättesaamiseks kasutavad bakterid eraldi transpordisüsteeme. Selleks, et lahustumatut rauda raku transportida, sünteesivad bakterid madala molekulmassiga ühendeid, siderofoore, mis viiakse rakust välja ja mille affiinsus Fe^{3+} suhtes on väga suur (Ji jt., 2012). Fe^{3+} -ga seondunud siderofoorid tuntakse ära raku pinnal paiknevate TonB-sõltuvate retseptoritega ja transporditakse seejärel periplasmasse, kasutades selleks prootonite gradiendi energiat, mida vahendab sisemembraani valk TonB (Noinaj jt., 2010). Periplasmast tsütoplasmasse saavad rauaioonid ABC transporterite abil, mis sõltuvalt siderofoorist vahendavad kas ainult Fe^{3+}

iooni või siderofooriga seondunud Fe^{3+} iooni transporti läbi membraani. Ka grampositiivsed bakterid kasutavad raua impordis ABC transportereid (Braun ja Hantke, 2011; Köster, 2001). Tsütoplasmasse sattunud siderofoorid lagundatakse esteraasidega ja siderofooridega seondunud raud vabaneb (Zhu jt., 2005). Nii Fe^{3+} iooni transpordil läbi ABC transporterit kui siderofoori lagundamise käigus redutseeritakse Fe^{3+} ioonid Fe^{2+} ioonideks (Hood ja Skaar, 2012).

1.4.1.2. Metalliooniõnide transport rakust välja

Sarnaselt siirdemetalle sisse transportivatele süsteemidele, on olemas metalliooniõne rakust välja transportivad kompleksid, mis kasutavad ioonide väljapumpamiseks kas ATP energiat või prootonite gradienti. Erinevalt impordisüsteemidest on pumbad aga enamasti metalliooniõnide suhtes valivamad, transportides ainult keemilistelt omadustelt ja elektronkatte struktuurilt sarnaseid ioone (Blencowe ja Morby, 2003). Lisaks võib gramnegatiivsetes bakterites eraldi gruppi paigutada RND valguperekonda kuuluvad süsteemid, mis ekspordivad metalliooniõne nii periplasmast kui tsütoplasmast. Ülejäänud süsteemid transpordivad metalliooniõne ainult tsütoplasmast periplasmasse (Nies, 2007). *P. aeruginosa*'s transpordib näiteks CopA1 süsteem ATP energia abil Cu^+ ioone periplasmasse, kust need võidakse RND perekonda kuuluva ja prootonite gradienti kasutava transporterit vahendusel rakust välja viia (Gonzalez-Guerrero jt., 2010). Üheks enim uuritud RND perekonna süsteemiks on *P. aeruginosa* CzcCBA katioon-prooton antiporter, mis ekspordib Co^{2+} , Zn^{2+} ja Cd^{2+} ioone ning mille geenide transkriptsioonitaset reguleerib CzcRS kahekomponentne signaalirada (Perron jt., 2004). Kahekomponentsed signaalirajad on kahest valgust, enamasti membraanis paiknevast signaali ära tundvast sensorvalgust ja tsütoplasmas paiknevast regulaatorvalgust, koosnevad süsteemid. Sensorvalk autofosforüleerub signaali äratundmisel, kannab fosfaatrühma üle regulaatorvalgule ja regulaatorvalk võib seejärel nii aktiveerida kui repressseerida teatud geenide transkriptsiooni (Stock jt., 2000). CzcRS süsteemis on sensorvalguks CzcS, mis autofosforüleerub, kui Zn^{2+} kogus keskkonnas suureneb (Joonis 3). CzcS-lt kantakse signaal edasi CzcR-le, mis aktiveerib *czcCBA* operoni transkriptsiooni ja metalliooniõne väljutava CzcCBA antiporterit hulk membraanis suureneb (Perron jt., 2004).



Joonis 3. *czcCBA* operoni transkriptsiooni regulatsioon ja CzcCBA vahendatud ionide transport. Tsingi liig aktiveerib CzcRS kahekomponentse süsteemi, mille regulaatorvalk CzcR aktiveerib *czcCBA* operoni transkriptsiooni. *czcCBA* kodeerib prootonite gradiendi abil Zn^{2+} , Cd^{2+} ja Co^{2+} ioone välja transportivat valgukompleksi (Perron jt., 2004).

1.4.2. Siirdemetalle siduvate valkude hulga reguleerimine

Lisaks siirdemetallide sisse- ja väljatranspordile reguleerivad bakterid metalli sisaldavate valkude kogust, et metallide vähesuse või liiaga hakkama saada. Kui vajalikku siirdemetalli on vähe, siis sünteesitakse vastavat metalli sisaldavaid valke vähem või asendatakse need valgud sarnase funktsiooni, kuid teist metalli kasutavate valkudega. Metallilii korral sünteesitakse metalli siduvaid ja üleliigsete metalliioonide hoiustamiseks mõeldud valke rohkem (Nies ja Grass, 2009).

Rauda sisaldavate valkude sünteesi reguleerib Fur, mis on rakusisest rauda kogust tunnetav regulaatorvalk ja mis Fe^{2+} -ga seondunult represseerib oma märklaudgeene (Bagg ja Neilands, 1987). Lisaks paljudele teistele geenidele represseerib Fur valk *E. coli*'s *ryhB* geeni. *ryhB* kodeerib väikest RNA-d, mis seondub ferritiini, bakterioferritiini ja superoksiidi dismutaasi SodB mRNA-dega, takistades sellega nende RNA-de transleerimist (Masse ja Gottesman, 2002). Ferritiin ja bakterioferritiin on üleliigse rauda hoiustamiseks mõeldud valgud, mis on olulised, sest vabad rauda ioonid on võimelised tekitama rakus hapniku- ja

hüdroksüülradikaale (Andrews, 1998). SodB on ainuke *E. coli* kolmest superoksiidi dismutaasist, mille kofaktoriks on Fe^{2+} (Dubrac ja Touati, 2000). Seega, kui rakus on palju rauda, siis sünteesitakse rauda hoiustavaid valke ja rauda sisaldavat superoksiidi dismutaasi, kui aga rauda on vähe, siis neid valke ei sünteesita (Masse ja Gottesman, 2002).

Üleliigse Zn^{2+} hoiustamiseks mõeldud valgud, metallotioniinid, on olemas väga paljudes eukarüootsetes rakkudes, kuid neid on leitud ka tsüanobakteritest ja pseudomonaadidest (Blindauer jt., 2002). Tsüanobakterites reguleerib metallotioniin SmtA hulka transkriptsiooniregulaator SmtB. Zn^{2+} -ga seondunud SmtB ei suuda *smtA* promootoralale seonduda ja *smtA* geeni transkribeerimist takistada. Seetõttu sünteesitakse metallotioniini siis, kui rakus on palju Zn^{2+} (Morby jt., 1993).

1.4.3. Membraani modifitseerimine

Vastusena metallide liiale või vähesusele muudavad bakterid ka membraani valgulist koostist ja modifitseerivad lipopolüsahhariide. Osa membraani valgulisest muutusest on seotud metalliioone sisse- ja väljatransportivate komplekside hulga muutmisega, kuid reguleeritakse ka teiste valguliste komplekside, peamiselt poriinide, koguseid (Manara jt., 2012; Nishino jt., 2006).

Membraani valgulise koostise muutumist kaadmiumilii korral on uuritud *Pseudomonas putida* Cd001 tüves. Leiti, et kaadmiumilii tingimustes väheneb välismembraanis paiknevate poriinide OprD ja OprI hulk ja suureneb poriinide OprF, OprL, OprH ja OprB kogus (Manara jt., 2012). OprH sarnase valgu H1 koguse suurenemist on näidatud ka teise *P. putida* tüve välismembraanis vase- ja kaadmiumilii korral (Miller jt., 2009). OprF ja OprL on peptiidoglükaaniga seonduvad poriinid (Hancock ja Brinkman, 2002) ja teatud tingimustes võib OprF olla vajalik raku kuju säilitamiseks (Rawling jt., 1998). Seetõttu arvatakse, et nende poriinide suurem kogus võib olla vajalik metallilii tingimustes membraani terviklikkuse säilitamiseks, mis passiivselt kaitseks rakku metalliioonide eest (Manara jt., 2012). Lisaks metalliioonide transporterite ja poriinide koguste muutumisele suureneb *P. putida* Cd001 membraanis ka raua omastamiseks vajalike TonB-sõltuvate retseptorite arv (Manara jt., 2012). Kuna kaadmiumilii hakkavad *P. aeruginosa* rakud tootma ka siderofoore (Dao jt., 1999), siis viitab see, et kaadmiumilii tekitab rakkudes rauanälja.

Lisaks membraani valgulise koostise muutmisele võidakse metallilii korral modifitseerida ka välismembraanis paiknevaid lipopolüsahhariide. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium's on näidatud, et raualiig aktiveerib PmrAB kahekomponentse

signaaliraja (Wösten jt., 2000), mis reguleerib mitmete lipopolüsahhariide modifitseerivate ensüümide ekspressiooni (Gunn jt., 1998; Nishino jt., 2006). Nende ensüümide vahendatud modifikatsioonide tulemusena väheneb lipopolüsahhariidide negatiivne laeng, mistõttu seondub bakteriga vähem Fe^{3+} ioone ja see aitab rakkudel raualiiga paremini taluda (Nishino jt., 2006).

1.4.4. Siirdemetallidega seotud kaitsemehhanismid eukarüootides

Eukarüootidel on erinevaid kaitsevastuseid neid ründavate patogeensete bakterite vastu. Üheks kaitsevastuseks on organismis bakterite läheduses raua, mangaani, tsingi ja vase hulga muutmine (Hood ja Skaar, 2012).

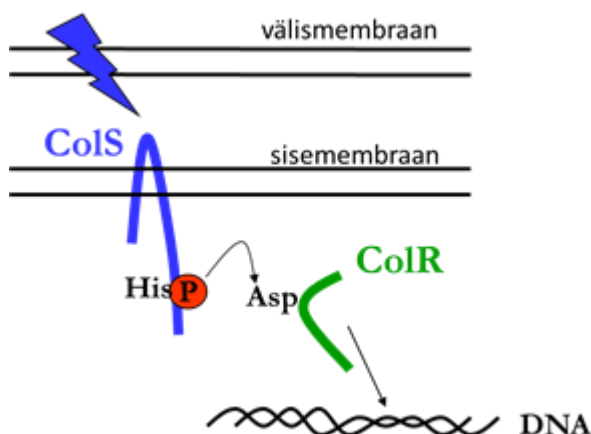
Raud on vajalik kõigile organismidele ning selgroogsed organismid üritavad muuta raua bakteritele võimalikult vähe kättesaadavaks. Raud on juba algselt organismides bakteritele raskesti kättesaadav, sest vaba rauda on vähe ja peamiselt on ta rakusiseste valkude nagu ferritiini ja hemoglobiini koostises või rakuväliselt transferriinis ja laktoferriinis (Hood ja Skaar, 2012). Sel ajal kui bakterid sünteesivad Fe^{3+} siduvaid siderofoore, sünteesivad eukarüootsed organismid valke, mis seonduvad siderofooridega ja takistavad seeläbi bakteritel raua omastamist (Flo jt., 2004). Selgroogsetes organismides tegelevad bakterite hävitamisega makrofaagid. Kui makrofaagil õnnestub fagotsütoosiga bakter alla neelata, siis satub bakter fagosoomi, mille membraanis asuvad Nramp1 valgukompleksid transpordivad Fe^{2+} ja Mn^{2+} ioone fagosoomist välja (Forbes ja Gros, 2003; Jabado jt., 2000). Seega vähendatakse fagosoomis bakterile kättesaadava raua ja mangaani hulka veelgi.

Vastupidiselt rauale ja mangaanile suurendatakse makrofaagi fagosoomis vastusena bakterile tsingi ja vase kogust. Tsink ja vask on suures koguses rakkudele toksilised ja pärast bakteri fagotsüteerimist suureneb Zn^{2+} ja Cu^{2+} ionide import fagosoomi (Botella jt., 2012). Transporditav tsink vabaneb makrofaagis olevate metallotioniin valkude koostisest (Botella jt., 2011). Seega kasutab eukarüootne organism bakterivastases võitluses nii bakterite näljutamist oluliste siirdemetallide suhtes kui ka nende metallidega mürgitamist.

1.5. ColRS kahekomponentne signaalirada

Kahekomponentsed signaalirajad on bakteritele vajalikud mitmesuguste keskkonnatingimuste, muu hulgas ka metallide hulga tunnetamiseks. Üheks konserveerunuks kahekomponentseks signaalirajaks pseudomonaadides on ColRS süsteem (Winsor jt., 2009), mis on käesoleva töö eksperimentaalse osa uurimisobjektiks.

ColRS on tüüpiline kahekomponentne süsteem (Joonis 4). ColS on membraanis paiknev sensorvalk, mis koosneb periplasmas asuvast signaali vastuvõtvast domäänist ja tsütoplasmasse jäävast histidiinkinaase aktiivsusega osast (Dekkers jt., 1998). Signaali äratundmisel autofosforüleerub ColS'i konserveerunud histidiinijääk, millelt kantakse fosfaatrühm edasi tsütoplasmas paikneva ColR regulaatorvalgu konserveerunud asparagiinhappejäägile (Hõrak jt., 2004). Fosforüleeritud ColR on võimeline geenide transkriptsiooni nii aktiveerima kui represserima (Kivistik jt., 2009).



Joonis 4. ColRS signaalirada. Signaali äratundmise järel fosforüleerib ColS sensorvalk ColR regulaatorvalgu, mis on seejärel võimeline nii aktiveerima kui represserima oma märklaudgeenide transkriptsiooni.

ColRS süsteemi kirjeldati esmakordselt *Pseudomonas fluorescens*'is kui süsteemi, mis on vajalik taimejuurte edukaks koloniseerimiseks konkurentsitingimustes (Dekkers jt., 1998). Sellele sarnaselt on leitud, et *P. putida*'s on *colS* kõrgelt ekspresseeritud just maisijuurtel kasvades (Ramos-Gonzalez jt., 2005).

P. fluorescens'is ja *P. putida*'s on ColRS signaalirada tõenäoliselt vajalik välismembraani struktuuri kontrollimiseks kuna mõlemas organismis reguleerib ColRS süsteem enda geenide kõrval paiknevat metüültransferaasi ja lipopolüsahhariidi fosfataasi kodeerivat operoni, mis oletatavalt osaleb lipopolüsahhariidide modifitseerimises (de Weert jt., 2006; Kivistik jt., 2009). *P. putida*'s on ColR-reguleeritavaid gene teada rohkem ja enam neist kodeerivad samuti kas membraanis paiknevaid või membraani modifitseerimisega seotud valke (Kivistik jt., 2009). Lisaks on teada, et *P. putida*'le on läbi ColRS süsteemi toimuv signaaliülekanne vajalik, et taluda membraanistressi, mille tekitab glükoosinappusest põhjustatud OprB1 suhkruporiini suurenenud ekspressioon (Putrinš jt., 2011).

Mitmetes bakteriliikides on ColRS signaalirada seotud virulentsusega. *P. aeruginosa* virulentsust on mõõdetud bakteri võimega tappa nematoodi *C. elegans* ja on näidatud, et *colS* geeni rikkumisel *P. aeruginosa* virulentsus väheneb (Garvis jt., 2009). Viimaste andmete järgi on ColRS süsteem tõenäoliselt seotud *P. aeruginosa* lipopolüsahhariidide modifitseerimisega, mille tulemusena muutuvad *P. aeruginosa* rakud tsüstilise fibroosi haigete kopsudes polümüksiini rea antibiootikumide suhtes resistentseks (Gutu jt., 2013). ColRS süsteemi seotust virulentsusega on näidatud ka taimi nakatava *Xanthomonas* perekonna liikides. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*'le on ColRS signaalirada vajalik tsitruseliste lehtede nakatamiseks, kuid ka biofilmi moodustamiseks ja lipopolüsahhariidide sünteesiks (Yan ja Wang, 2011). *Xanthomonas campestris* patovar *campestris*'el on kolm ColRS süsteemi homoloogit ja nendest üks on vajalik bakterile rediselehtede nakatamisel (Zhang jt., 2008).

On ka mitmeid artikleid, mis viitavad, et ColRS süsteem osaleb metallide homöostaasi reguleerimisel. *P. putida* CD2 *colR*- ja *colS*-defektsed tüved on võrreldes algse tüvega palju tundlikumad Mn^{2+} suhtes, kuid suurenenud on ka nende tüvede Cd^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} ja Pb^{2+} tundlikkus (Hu ja Zhao, 2007). *Xanthomonas citri* subsp. *citri* on *colR* ja *colS* geenide defektsuse korral tundlikum Cu^{2+} suhtes (Yan ja Wang, 2011) ja *Xanthomonas campestris* patovar *campestris* Cd^{2+} suhtes (Zhang jt., 2008). Samas on näidatud, et *Xanthomonas oryzae* patovar *oryzae* *colS*-defektne tüvi kasvab halvemini rauavaestes tingimustes, mis vastupidiselt ülejäänud näidetele viitab, et ColRS süsteem on vajalik metallivaestes tingimustes (Subramoni jt., 2012).

Kokkuvõtlikult võib öelda, et kuigi ColRS signaaliraja kohta on andmeid erinevatest bakteriliikidest ja tema osalust on kirjeldatud väga erinevates fenotüüpides, pole seni siiski selge, mis on selle signaaliraja täpne funktsioon. Enamus andmeid viitab, et ColRS süsteemi on vaja membraani stabiilsuse kontrollimiseks, aga seni pole teada, millistel tingimustel see signaalirada aktiveerub ja millised muutused vastusena membraanis toimuvad. Enamikus bakterites ei teata ka ColRS süsteemi märklaudgeene ja kuigi *P. putida*'s on kümme *colR*-sõltuvat geeni teada, pole see ilmselt veel kogu ColR regulon.

2. Eksperimentaalne osa

2.1. Töö eesmärgid

Mitmetes bakteriliikides on ColRS kahekomponentne signaalirada seotud metalliia talumisega. *P. putida* CD2 tüvi muutub ColRS süsteemi puudumisel Mn^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} ja Pb^{2+} tundlikumaks (Hu ja Zhao, 2007). *X. citri* subsp. *citri*'le on ColRS süsteem vajalik Cu^{2+} liia (Yan ja Wang, 2011) ja *X. campestris* patovar *campestris*'le Cd^{2+} liia talumiseks (Zhang jt., 2008). Nendest andmetest lähtuvalt püstitasime hüpoteesi, et ColS on metallisensor, mis vastusena metalli liiale aktiveerib ColR'i ning järgnev ColR reguloni aktivatsioon kaitseb bakterit metallistressi tingimustes. Selle hüpoteesi kontrollimiseks püstitati käesoleva töö eesmärkideks:

- 1) selgitada, kas *P. putida* PaW85 tüvele on ColRS süsteem vajalik metalliia tingimustes;
- 2) teha kindlaks, kas metalliliig aktiveerib ColRS signaaliraja;
- 3) teha kindlaks, kas metalliioonid on signaaliks, mida ColS valk ära tunneb;
- 4) analüüsida, kas ColRS süsteem on metalliia tingimustes vajalik välismembraani lipopolüsahhariidide mustri või valgulise koostise muutmiseks.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Kasutatud söötmed, bakteritüved ja plasmiidid

Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid on toodud Lisas 1. Söötmena kasutati LB söödet (1% trüptoon, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl). Tardsöötmed sisaldasid 1,65% agarit. Erinevate tüvede metallitundlikkuste hindamise LB tardsöötmed sisaldasid 2 või 2,3 mM ZnSO₄, 2 või 2,3 mM FeSO₄, 2 mM FeCl₃, 3 mM MnCl₂, 0,2 mM CoCl₂, 3,5 mM CuSO₄, 1 mM NiSO₄ või 0,3 mM CdSO₄. Rakkude kasvatamisel LB vedelsöötmes lisati söötlele metallisooli järgmiste lõppkontsentratsioonidega: 0,6 või 1,7 mM ZnSO₄, 0,2 mM FeSO₄, 0,5 mM MnCl₂, 0,1 mM CoCl₂, 2 mM CuSO₄, 0,5 mM NiSO₄ või 0,2 mM CdSO₄. Selektiooniks kasutati antibiootikume kanamütsiin (Km; 50 µg/ml), streptomütsiin (Sm; *E. coli* jaoks 20 µg/ml ja *P. putida* jaoks 200 µg/ml), ampitsilliin (Amp; 100 µg/ml) ja bensüülpenitsilliin (Bp; 800 µg/ml). *Escherichia coli* rakke kasvatati 37°C ja *Pseudomonas putida* rakke 30°C juures. Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti kultuure loksutil.

2.2.2. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR'i reaktsioonimahuks oli 20 µl ja reaktsioonisegu sisaldas 1x PCR puhvrit (75 mM Tris-HCl pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 10 pmol praimereid, 0,5 ühikut Taq või Pfu DNA polümeraasi ja matriits-DNA'd. Matriitsina kasutati kas bakterirakke või puhastatud plasmiidset DNA'd. Praimeritena kasutatud oligonukleotiidid on toodud Tabelis 1. PCR'l viidi läbi 25 tsüklit, mis sisaldasid järgmisi etappe:

- 1) DNA denaturatsioon – 1 minut temperatuuril 95°C
- 2) praimeri seondumine matriits-DNA'le – 30 sekundit temperatuuril 55°C
- 3) DNA süntees – 30 sekundit kuni 4 minutit sõltuvalt sünteesitava DNA pikkusest ja kasutatud DNA polümeraasist.

Tabel 1. Töös kasutatud oligonukleotiidid

Oligonukleotiidi nimi	Järjestus	Kasutamine
Smut_1	5'-TTT GCC CTG ATG AGC GCG CT-3'	
Smut_2	5'-GCA ACC AGC CAG CCA AGG AT-3'	
S_E38Q	5'-GAA ATC AGT CGC TCT TGG ACC AGG TGC AC-3'	
S_D57N	5'-TCA CTG ACG CTG TTC ATA CGC AGC AG-3'	

S_E96Q	5'-CGC GGT TTC CAC CAG GTG TTC CGA GA-3'	Mutatsiooniga <i>colS</i> geeni sisaldavate <i>colS</i> -defektsete tüvede konstrueerimine ja kontrollimine
S_E126Q	5'-CAG AGC GAC TTC CAG GAG CGC GA-3'	
S_E129Q	5'-TTC GAG GAG CGC CAG CGC GTG CTT TTT GC-3'	
S_E126Q_E129Q	5'-CAG AGC GAC TTC CAG GAG CGC CAG CGC GTG CTT TTT GC-3'	
prtac	5'-AA TTA ATC ATC GGC TCG TAT AA-3'	
Tn7R109	5'-CAG CAT AAC TGG ACT GAT TTC AG-3'	
Tn7GlmS	5'-AAT CTG GCC AAG TCG GTG AC-3'	
cptAees	5'-GTA TGC CTC GTC GTA CCT T-3'	PP2579 geeni deletsioontüvede konstrueerimine ja kontrollimine
2580SacI	5'-CCG AGC TCA TCA TGA CGC GCA TCA TT-3'	
cptApikk	5'-AAG GTA CGA CGA GGC ATA CTA CCG CAA GAA TGG CTT GCG-3'	
2578SalI	5'-CAG GTC GAC CGC CCA CAG T-3'	
33EcoRI	5'-TTA GAA TTC CAG ATT TGA AGA TTT AAC G-3'	PP0035-PP0034-PP0033 operoni deletsioontüvede konstrueerimine ja kontrollimine
33lopp	5'-AAT GCG GAA ACG CCT CGC AA-3'	
35pikk	5'-TTG CGA GGC GTT TCC GCA TAG CCT ATG GAG GCA AAG GT-3'	
35SalI	5'-ATT GTC GAC AAA CAC GGG AGC ACC AA-3'	
PP0036alg	5'-AAG GAT CCA ATA TGT CAG GGC TGT-3'	
903SacI	5'-TAG AGC TCA CCC TGT ATT TCG ATG GC-3'	PP0903-PP0904-PP0905 operoni deletsioontüvede konstrueerimine ja kontrollimine
orf222alg	5'-TTC AAG CTT GAT GGG GCT ACG-3'	
905jarel	5'-GTA GCC CCA TCA AGC TTG AAT GCG TTA GCT GGA AAA GCC-3'	
905KpnI	5'-TAT GGT ACC CAG GTC GGG CTG GTG A-3'	
Fw	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'	kloneerimiste kontrollimine
Rev	5'-AAC AGC TAT GAC CAT G-3'	
psw-F	5'-GGA CGC TTC GCT GAA AAC TA-3'	pSW (I-SceI) plasmidi kontroll
psw-R	5'-AAC GTC GTG ACT GGG AAA AC-3'	

2.2.3. Kloneerimine

Kloneerimisel kasutati firma *Thermo Scientific* ensüüme. Iga ColR-reguleeritava geeni või operoni deletsiooni sisaldava DNA lõigu tekitamiseks viidi läbi kolm PCR reaktsiooni (Tabel 2). I ja II PCR reaktsioon viidi läbi paralleelselt ja selle käigus amplifitseeriti umbes 500 aluspaari pikkused järjestused mõlemalt poolt deleteeritavat piirkonda. Saadud PCRprodukte töödeldi 2,5 ühiku eksonukleas I'ga (ExoI) ja neid kasutati matriitsina kolmandas PCR reaktsioonis, mille käigus kleebiti I ja II reaktsioonisegu DNA fragmendid

omavahel kokku. Tekkinud fragmente lõigati sobivate restriктаasidega (Tabel 2) ning kioneeriti samade restriктаasidega avatud pEMG vektorisse. Selle tulemusena saadi pEMG/Δ35-33, pEMG/Δ903-905 ja pEMG/Δ2579 plasmiidid.

Tabel 2. ColR-reguleeritava geeni või operoni deletsiooniga fragmentide tekitamiseks kasutatud praimerid ja nende kioneerimisel kasutatud restriктаasid

deletsioon	I PCR praimerid	II PCR praimerid	III PCR praimerid	kasutatud restriктаasid
Δ35-33	33EcoRI+33lopp	35pikk+35SalI	33EcoRI+35SalI	EcoRI ja SalI
Δ903-905	903SacI+orf222alg	905jarel+905KpnI	903SacI+905KpnI	SacI ja KpnI
Δ2579	2580SacI+cptAees	cptApikk+2578SalI	2580SacI+2578SalI	SacI ja SalI

Iga erineva mutatsiooniga *colS* geeni fragmendi tekitamiseks viidi läbi kaks PCR reaktsiooni. Esimeses PCR reaktsioonis kasutati ColS'i periplasmaatilist osa kodeeriva järjestusega komplementaarset, kuid kindlat mutatsiooni sisaldavat praimerit ja teise praimerina Smut_1 või Smut_2'de (Tabel 3). Saadud PCRprodukte töödeldi 2,5 ühiku ExoI'ga ja kasutati koos Smut_1 või Smut_2 praimeriga teises PCR reaktsioonis (Tabel 3). Kõigis reaktsioonisegudes kasutati matriitsina pUCNot/lacItaccolS plasmidi. Teises PCR reaktsioonis saadud DNA fragmente töödeldi DpnI, Mva1269I ja Bpu1102I restriктаasidega ning fragmendid kioneeriti Mva1269I ja Bpu1102I restriктаasidega avatud ning aluselise fosfataasiga (FastAP) töödeldud pUCNot/lacItaccolS plasmidi. Tulemusena saadi pUCNot/lacItaccolS-E38Q, pUCNot/lacItaccolS-D57N, pUCNot/lacItaccolS-E96Q, pUCNot/lacItaccolS-E126Q, pUCNot/lacItaccolS-E129Q ja pUCNot/lacItaccolS-E126QE129Q plasmiidid (Lisa 1).

Tabel 3. Mutatsiooni sisaldavate *colS* geenifragmentide tekitamiseks kasutatud praimerid

ColS'i viidav mutatsioon	I PCR praimerid	II PCR praimerid
E38Q	S_E38Q+Smut_1	I PCR produkt+Smut_2
D57N	S_D57N+Smut_1	I PCR produkt+Smut_2
E96Q	S_E96Q+Smut_2	I PCR produkt+Smut_1
E126Q	S_E126Q+Smut_2	I PCR produkt+Smut_1
E129Q	S_E129Q+Smut_2	I PCR produkt+Smut_1
E126 ja E129Q	S_E126Q_E129Q+Smut_2	I PCR produkt+Smut_1

Mutantseid ColS valke kodeerivatest plasmidest ja ka esialgselt pUCNot/lacItaccolS plasmidist NotI restriктаasiga välja lõigatud erinevad lacItaccolS järjestused kioneeriti

NotI'ga avatud pBK-miniTn7-ΩSm plasmidi, Tn7 minitransposooni sisse. Sel viisil saadi pminiTn7lacItac-colS, pminiTn7lacItac-colS-E38Q, pminiTn7lacItac-colS-D57N, pminiTn7lacItac-colS-E96Q, pminiTn7lacItac-colS-E126Q, pminiTn7lacItac-colS-E129Q ja pminiTn7lacItac-colS-E126QE129Q plasmiidid (Lisa 1).

2.2.4. Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon

E. coli CC118λpir DNA-kompetentsete rakkude valmistamiseks külvati 150 µl üleöö 4,5 ml LB söötmes 37°C juures kasvanud rakke ümber 4 ml YENB söötmesse (0,75% „Bacto yeast extract“; 0,8% „Bacto nutrient broth“) ja kasvatati 37°C juures optilise tiheduseni 0,5-0,9 ($\lambda=580$ nm). Söötmes olnud rakud tsentrifuugiti põhja (30 sekundit, 12100 g), kallati sööde pealt ära ja rakke pesti kaks korda 800 µl destilleeritud veega ning üks kord 800 µl 10% glütserooliga. Rakud suspendeeriti 100 µl 10% glütseroolis.

P. putida kompetentide valmistamiseks kasvatati rakke üleöö 4,5 ml LB söötmes 30°C juures. Rakud tsentrifuugiti kokku 250 µl rakukultuurist (1 minut, 12100 g), pesti kolm korda 300 mM sahharoosiga ja võeti üles 100 µl 300 mM sahharoosis.

Kompetentsetele rakkudele lisati 0,1-1 µg vees lahustatud DNA'd. Rakud pipeteeriti elektroporatsiooni küveti ja elektroporatsioon teostati *BioRad* elektroporaatoriga pingel 2500 V. Küvetist pesti rakud välja 1 ml LB söötmega, mille järel *E. coli* rakud kasvasid 45 minutit 37°C juures ja *P. putida* rakud 45 minutit kuni 3 tundi (pEMG derivaatide puhul) 30°C juures loksutil. Seejärel plaaditi rakud selektiivsöötmele.

2.2.5. DNA eraldamine ja restriksioonanalüüs

Plasmiidse DNA eraldamiseks kasutati firma *Favorgen* DNA eraldamise kitti *FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit* ja järgiti tootja protokoll. DNA elueeriti 60 µl Milli-Q veega.

Eraldatud DNA'd kontrolliti restriksiooniga, mida analüüsiti geelelektroforeesiga. DNA proovile lisati värv (0,04% broomfenoolsinine; 50% glütserool) ja kanti 1%-sele agarosgeelile 1x TAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA, pH 8,2), mis sisaldas etiidiumbromiidi lõppkonsentratsiooniga 0,33 µg/ml. Elektroforees toimus toatemperatuuril pingel 10-15 V/cm. Geeli pildistati ultravioletvalguses.

2.2.6. DNA sekveneerimine

Sekveneerimisproovi valmistamiseks kasutati firma *Applied Biosystems* *BigDye Terminator v3.1* sekveneerimiskitti ja tootjafirma modifitseeritud protokoll, millele vastavalt sisaldas 10 µl reaktsioonisegu 2 µl 5x lahjenduspuhvrit (200 mM Tris pH 9,0; 6 mM MgCl₂); 1,6 pmol praimerit; 0,7 µl premix'i (*Big Dye PR-100 mix v3.1*); 1 µl sekveneeritavat PCR-i produkti. Reaktsioon toimus 35 tsüklina tingimustel

- 1) 15 sekundit 95°C
- 2) 10 sekundit 50°C
- 3) 45 sekundit 60°C

Reaktsioonisegus kasutatud PCR produkti oli eelnevalt töödeldud 2,5 ühiku eksonukleas I'ga (ExoI, *Thermo Scientific*) ning 1 ühiku aluselise fosfataasiga (FastAP, *Thermo Scientific*) järgmistel tingimustel: 37°C 15 minutit ja 80°C 15 minutit.

DNA sekveneeriti *Applied Biosystems 3730x1* kapillaarsekvenaatoriga ning saadud järjestusi analüüsiti *BioEdit* programmiga.

2.2.7. Deletsioonmutantide konstrueerimine

Deletsioonmutantide konstrueerimiseks kasutati Victor de Lorenzo laboris välja töötatud meetodikat (Martinez-Garcia ja de Lorenzo, 2011). Sellele vastavalt viidi geeni või operoni deletsiooniga fragmenti sisaldav pEMG plasmiid *P. putida* erinevate tüvede rakkudesse ja selekteeriti kanamütsiiniresistentsed kointegraadid, mis sisaldasid nii tervet kui deletsiooniga lookust. Kointegraatidesse viidi sisse I-SceI nukleas kodeeriv plasmiid pSW(I-SceI). I-SceI ekspressiooni indutseerimiseks ja homoloogilise rekombinatsiooni võimaldamiseks kasvatati rakke vähemalt 16 tundi 1,5 mM metüülbensoaati sisaldavas söötmes. Seejärel külvati rakud LB söötmele ja selekteeriti välja kanamütsiinitundlikud rakud. Deletsiooni olemasolu kontrolliti PCR abil (Tabel 1) ja I-SceI nukleas kodeerivast plasmiidist vabanemiseks kasvatati rakke paar päeva mitteselektiivses söötmes ning valiti välja bensüülpenitsilliini suhtes tundlikud kloonid.

2.2.8. *colS*-defektse tüve komplementeerimine algse või mutantse ColS'ga

Algse ja mutatsiooniga *colS* geeni sisaldavate tüvede konstrueerimiseks viidi erinevat lacIaccolS ekspressioonikasseti sisaldav pBK-miniTn7-ΩSm plasmiid (Lisa 1) koos pUXBF13 plasmiidiga *P. putida colS* tüve rakkudesse. Selekteeriti välja

streptomütsiiniresistentsed, kuid bensüülpenitsilliinitundlikud transformandid ja ekspressioonikasseti olemasolu genoomis Tn7 insertisioonikohas kontrolliti PCR abil kasutades prtac ja Smut_2 ning Tn7R109 ja Tn7GlmS praimereid.

2.2.9. Metallitundlikkuse analüüs

P. putida colR ja *colS* tüvede metallitundlikkuse hindamiseks tehti üleöö 4,5 ml 30°C juures kasvanud rakkudest 10- kuni 10⁶-kordne lahjenduste rida ja igast lahjendusest külvati 5 µl erinevat siirdemetalli sisaldavale LB tardsöötmele. Siirdemetallide kontsentratsioonid söötmetes olid 2 mM ZnSO₄, 2 mM FeSO₄, 3 mM MnCl₂, 0,2 mM CoCl₂, 3,5 mM CuSO₄, 1 mM NiSO₄ või 0,3 mM CdSO₄. Fe²⁺ ja Fe³⁺ tundlikkuse hindamiseks külvati tüved nii vahetult enne katset valmistatud kui umbes kuu aega seisnud 2 mM FeSO₄ sisaldavatele LB tardsöötmetele ning 2 mM FeCl₃ sisaldavale söötmele.

Tsingi minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni (MIC) määramiseks kasvatati baktereid mikrotiiterplaadis, mille kannudesse tehti LB söötmesse ZnSO₄ kontsentratsiooni alanev rida. Kasutati kahte erinevat ZnSO₄ lahjendusrida: 1) 12 mM, 6 mM, 3 mM, 1,5 mM ja 0,75 mM ning 2) 5 mM, 4 mM, 3,5 mM, 3 mM, 2,5 mM, 2 mM, 1,75 mM ja 1,5 mM. Üleöö 30°C juures kasvanud rakkude 10-kordsest lahjendusest külvati igasse kannu 5 µl (~5x10⁵ rakku). Rakud kasvasid 24 tundi 100 µl söötmes 30°C juures loksudes. Kasvu võrdlemiseks mõõdeti rakukultuuride optilised tihedused lainepikkusel 580 nm.

2.2.10. β-galaktosidaasi eriaktiivsuse määramine

β-galaktosidaasi eriaktiivsused määrati *P. putida* PaW85, *colR* ja *colS* tüve rakkudest, mis sisaldasid p9TT_BlacZ/35, p9TT_BlacZ/268, p9TT_BlacZ/900, p9TT_BlacZ/903, p9TT_BlacZ/737, p9TT_BlacZ/1636, p9TT_BlacZ/2579 või p9TT_BlacZ/5152 plasmidi ja lisaks PaW85 tüve rakkudest, mis sisaldasid p9TT_BlacZ/36, p9TT_BlacZ/*colR*, p9TT_BlacZ/1288, p9TT_BlacZ/1915, p9TT_BlacZ/2560, p9TT_BlacZ/2561 või p9TT_BlacZ/3766 plasmidi (Lisa 1).

Rakud kasvasid umbes 20 tundi 30°C juures 4,5 ml LB söötmes või metallisoola sisaldavas LB söötmes. Metallisoolade lõppkontsentratsioonid söötmes olid järgmised: 0,6 või 1,7 mM ZnSO₄, 0,2 mM FeSO₄, 0,5 mM MnCl₂, 0,1 mM CoCl₂, 2 mM CuSO₄, 0,5 mM NiSO₄ või 0,2 mM CdSO₄.

β-galaktosidaasi eriaktiivsuse määramiseks kasutati Milleri meetodit (Miller, 1972), millele vastavalt valmistati reaktsioonisegu: 1,6 ml Z-puhvrit (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM MgSO₄, 50 mM β-merkaptotoetanool, 0,0005% SDS, pH 7), 0,4 ml ONPG

(orto-nitrofenüül- β -Dgalaktopüranosiid, 4 mg/ml) lahust, 100 μ l kloroformi ja 50 μ l rakukultuuri. Piisavalt kollase värvuse tekkimisel peatati reaktsioon 1 ml 1 M NaCO₃-ga, fikseeriti aeg ja mõõdeti reaktsioonisegu optilised tihedused lainepikkustel 420 ja 550 nm. Eriaktiivsuse (E) väärtus arvutati välja Milleri ühikutes kasutades valemit

$$E = 1000 \frac{A_{420} - A_{550}}{A_{580} \times t \times V}$$

kus A₄₂₀ ja A₅₅₀ on reaktsioonisegu optilised tihedused lainepikkustel 420 ja 550 nm, A₅₈₀ rakkude optiline tihedus lainepikkusel 580 nm, t reaktsiooniaeg minutites ja V reaktsioonisegusse lisatud rakukultuuri ruumala ml-tes.

2.2.11. Western blot analüüs

Western blot meetodit kasutati ColR valguga hulga hindamiseks LB söötmes ja ZnSO₄ sisaldavas LB söötmes kasvanud PaW85 tüve rakkudes.

Üleöö 5 ml-s kasvanud rakud koguti tsentrifuugimisega (1 minut, 12100 g). Rakud suspendeeriti 300 μ l 1 M NaCl sisaldavas 50 mM fosfaatpuhvris (pH 7,6) ja purustati ultrasonikaatoriga (*4710 Series Ultrasonic Homogenizer, Cole-Parmer Instruments Co.; output=100*) kahe 10-sekundilise tsükliga, hoides rakke jääl. Purustatud rakkude lahustumatu fraktsioon tsentrifuugiti põhja (10 minutit, 10 000 g, 4°C) ning eraldatud supernatandis määrati valgukontsentratsioon *Bio-Rad'i Quick Start* Bradfordini reagentidega vastavalt tootja protokollile.

Valmistati valguproovid, mis sisaldasid 7 μ g analüüsitavat valgususpensiooni ja 7 μ l 2x Laemmli puhvrit (0,125 M Tris, 20% glütserool, 2% SDS, 2% β -merkaptotetanool, 0,001% broomfenoolsinine, pH 6,8) ning mille maht viidi 50 mM fosfaatpuhvriga (pH 7,6) 15 μ l-ni. Valguproove kuumutati 96°C juures 10 minutit ja lahutati 12,5% Tritsiin-SDS-polüakrüülamiid geelis (Schägger, 2006) konstantsel pingel 120 V.

Geelis lahutunud valgud kanti membraanile (*GE Healthcare AmershamTM*), kasutades *Trans-Blot[®] SD (BIO-RAD)* ülekandeaparaati ja ülekandepuhvrit (25 mM Tris pH 8,3; 192 mM glütsiin; 0,02% SDS; 20% metanool) ning rakendades voolutugevust 3-5 mA/cm² 30 minuti jooksul.

Membraanil olevate valkude visualiseerimiseks hoiti membraani järgnevatel lahustes: 1 tund blokeerimislahuses (1xTBS; 5% lõss; 0,05% Tween 20), 1 tund ColR'i vastast polüklonaalset antikeha sisaldavas blokeerimislahuses (suhtes 1:280), 3x 4 minutit pesulahuses (50 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20), 1 tund *Goat anti-rabbit IgG* antikeha sisaldavas blokeerimislahuses (suhtes 1:5000) ning membraani pesti uuesti 3x 4

mitutit pesulahusega. Valgud ilmutati AP puhvriga (100 mM Tris pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 330 µg/ml NBT ja 165 µg/ml BCIP) ja reaktsioon peatati stopplahusega (1xTBS; 20 mM EDTA).

2.2.12. Välismembraani valkude eraldamine

Välismembraani valgud eraldati LB's ja 0,6 mM ZnSO₄ sisaldavas LB söötmes kasvanud *P. putida* PaW85 ning *colR* tüvede rakkudest.

25 ml's kasvanud rakud tsentrifuugiti põhja (10 minutit, 10 000 g, 4°C) ning võeti üles 3 ml 10 mM HEPES puhvris (pH 7,4). Rakke hoiti üleöö -20°C juures ning seejärel purustati nad ultrasonikaatoriga kuue 10-sekundilise tsükliga. Purustatud rakke tsentrifuugiti (10 minutit, 10 000 g, 4°C) ja eraldatud supernatandist sadestati membraanivalgud (1 tund, 100 000 g, Beckman SW 55 Ti rootor, 4°C). Sade suspendeeriti 2 ml 1% N-lauroülsarkosiini sisaldavas 10 mM HEPES puhvris (pH 7,4) ning lahust inkubeeriti loksutil 37°C juures 30 minutit. Välismembraanid sadestati tsentrifuugimisel (1 tund, 100 000 g, 4°C). Sadet pesti N-lauroülsarkosiinist vabanemiseks 3 ml HEPES puhvriga (pH 7,4) ning välismembraanid sadestati tsentrifuugimisega samadel tingimustel. Saadud sade suspendeeriti 150 µl HEPES puhvris (pH 7,4) ja preparaate valgusisaldus määrati *Bio-Rad*'i *Quick Start* Bradfordin reagentiga vastavalt tootja protokollile.

Valkude lahutamiseks geelil valmistati valguproovid, mis sisaldasid 0,5 µg välismembraani valke ja 3 µl 2x Laemmli puhvrit (0,125 M Tris, 20% glütserool, 2% SDS, 2% β-merkaptotetanool, 0,001% broomfenoolsinine, pH 6,8). Proovi maht viid 6 µl-ni 10 mM HEPES puhvriga. Valguproove kuumutati valkude denatureerimiseks 90°C juures 10 minutit ning proovid kanti 10% Tritsiin-SDS-polüakrüülamiidgeelile. Valgud lahutati konstantsel pingel 120 V ja värviti AgNO₃-ga vastavalt (Chevallet jt., 2006) protokollile.

2.2.13. Lipopolüsahhariidide eraldamine

Lipopolüsahhariidid eraldati üleöö LB's ja 0,6 mM ZnSO₄ sisaldavas LB söötmes kasvanud *P. putida* PaW85, *colR* ja *colS* tüve rakkudest. 1 ml üleöö kasvanud kultuurist koguti rakud tsentrifuugimisega (1 minut, 12100 g). Rakud suspendeeriti 50 µl lüüsipuhvris (2% SDS; 4% 2-merkaptotetanool; 10% glütserool; 1 M Tris pH 6,8; 0,0001% broomfenoolsinine), kus neid inkubeeriti 10 minutit 100°C juures. Lüüsisegule lisati 25 µg proteinaas K'd ja inkubeeriti tund aega 60°C juures. Saadud preparaati kasutati lipopolüsahhariidide amalüüsimiseks ja säilitati -20°C juures.

Lipopolüsahhariidid lahutati 15% ilma SDS-ta polüakrüülamiidgeelis konstantsel pingel 120 V. 25 korda lahjendatud lipopolüsahhariidide preparaati kuumutati 96°C juures 10 minutit ja geelile kanti 3 µl lahjendusest. Geeli värviti AgNO₃-ga vastavalt (Kittelberger ja Hilbink, 1993) protokollile.

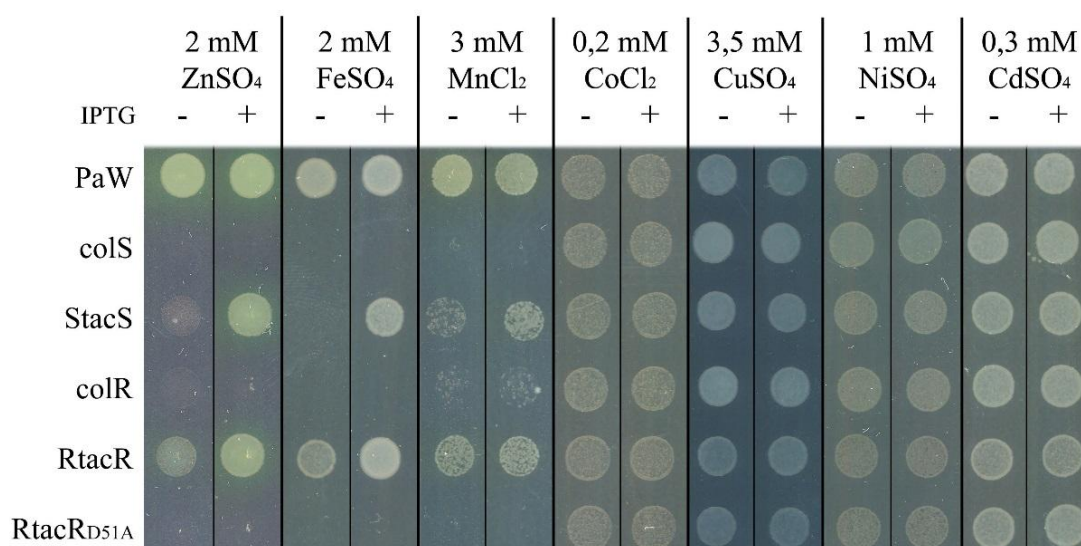
2.2.14. Lipopolüsahhariidide suhte määramine

Pika- ja lühikeseahelaliste lipopolüsahhariidide suhte määramiseks kasutati ImageQuant programmi, mille abil leiti LPS'i vöötide tugevuse järgi mitu protsenti moodustavad pikad ja mitu protsenti lühikesed lipopolüsahhariidid ühel geelirajal olevatest lipopolüsahhariididest. Lipopolüsahhariidide suhte arvutamisel jagati lühikeste lipopolüsahhariidide protsent pikkade lipopolüsahhariidide protsendiga.

2.3. Tulemused

2.3.1. *P. putida* PaW85 *colR*- ja *colS*-defektsed tüved on tundlikud tsingi-, raua- ja mangaaniliiiale

ColRS süsteemi vajalikkust metalliliiia talumisel on näidatud mitmetes bakteriliikides (Hu ja Zhao, 2007; Zhang jt., 2008; Yan ja Wang, 2011). Selleks, et kindlaks teha, kas ka *P. putida* PaW85 tüves on ColRS süsteem seotud metalliliiia talumisega, võrdlesin *P. putida* PaW85 ja tema *colR*- ning *colS*-defektsete tüvede kasvamist erinevaid metalle sisaldavatel söötmetel. Selgus, et *colR*- ja *colS*-defektsed tüved ei suuda kasvada LB söötmel, kus on palju ZnSO₄, FeSO₄ või MnCl₂ sooli (Joonis 5). CoCl₂, CuSO₄, NiSO₄ või CdSO₄ võimalikult suured kogused, kus *P. putida* algtüve rakud veel kasvada suudavad, mutantsete tüvede kasvu võrreldes algtüvega ei mõjutanud. Seega vajab *P. putida colRS* geene eelkõige tsingi-, raua- ja mangaaniliiias kasvamisel.



Joonis 5. *P. putida* erinevate tüvede kasv metallisooli sisaldavatel LB söötmetel. Tüved on tähistatud järgmiselt: PaW – algtüvi PaW85; colS – *colS*-defektne tüvi; StacS – *colS*-defektne tüvi, millesse on viidud tac promootorilt ekspresseeritav *colS* geen; colR – *colR*-defektne tüvi; RtacR – *colR*-defektne tüvi, millesse on viidud tac promootorilt ekspresseeritav *colR* geen ja RtacR_{D51A} – *colR*-defektne tüvi, millesse on viidud tac promootorilt ekspresseeritav mutatsiooni D51A kandev *colR* geen. IPTG lisamine söötmesse on tähistatud pluss märgiga. Tasse pildistati pärast 20-tunnist kasvamist 30°C juures. Ühes täpis oli külvihetkel ligikaudu 5000-50 000 rakku.

Kui *colR*- ja *colS*-defektsete *P. putida* tüvede tsingi-, raua- ja mangaanitundlikkuse suurenemine on põhjustatud ColR või ColS valgu puudumisest, siis peaksid nende tüvede

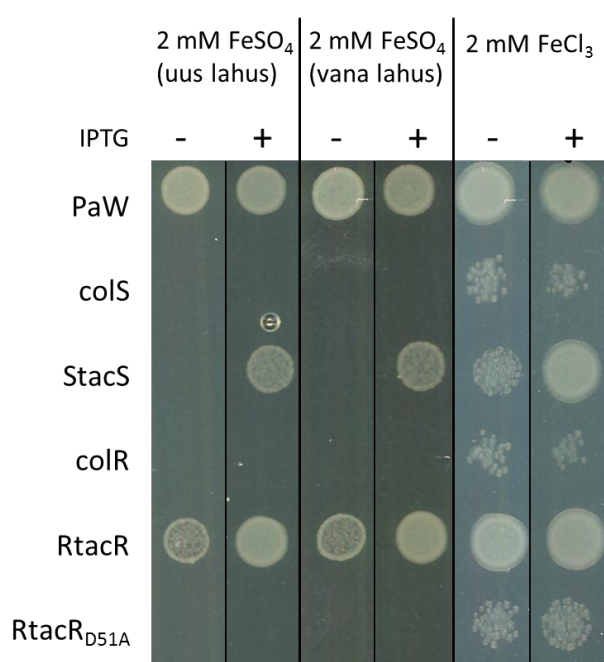
metallitaluvused taastuma, kui mutantsetes tüvedes vastavate valkude süntees taastada. Selle testimiseks kasvasin metalle sisaldavatel söötmetel ka selliseid *colR*- ja *colS*-defektseid tüvesid, kuhu on sisse viidud *colR* või *colS* geen, mis ekspresseerub IPTG-ga indutseeritavalt tac promootorilt (RtacR ja StacS tüved). Tulemused näitasid, et kui ilma IPTG-ta kasvavad StacS rakud ZnSO₄, FeSO₄ või MnCl₂ sisaldaval söötmel algtüvest halvemini, siis IPTG-d sisaldaval söötmel kasvab StacS tüvi kõikide metallide liia korral sama hästi kui algtüvi (Joonis 5). Seega taastab ColS valgu ekspressioon *colS*-defektse tüve tsingi- raua- ja mangaanitaluvuse ja järelikult on *colS*-defektse tüve metallitundlikkus seotud just ColS valgu puudumisega. Ka ColR valgu ekspresseerimine tac promootorilt taastab *colR*-defektse tüve metallitaluvuse, kuid erinevalt StacS tüvest kasvavad indutseeritavat *colR* geeni sisaldavad RtacR rakud juba ilma IPTG-ta ZnSO₄, FeSO₄ ja MnCl₂ sisaldaval söötmel paremini kui *colR*-defektse tüve rakud (Joonis 5). See tulemus oli ootuspärane, sest varem on näidatud, et RtacR rakkudes pole tac promootor täielikult repressseeritud ja ka ilma IPTG induktioonita on ColR'i ekspressioon piisav *colR*-defektsuse komplementeerimiseks (Hõrak jt., 2004).

Kuna *P. putida* metalliresistentsuses on olulised nii ColS kui ka ColR, siis oletasime, et vajalik on nende valkude vaheline signaaliülekanne. ColRS süsteemis toimub signaaliülekanne sensorvalgult ColS regulaatorvalgule ColR nii, et ColS'lt kantakse fosfaatrühm üle ColR'i 51. aminohappele, asparagiinhappele, ning selle muteeriminealaniiniks (D51A) muudab ColR'i fosforüleerumisvõimetuks (Hõrak jt., 2004). Et kindlaks teha, kas metallitaluvuse tagamisel on lisaks ColR ja ColS valgu olemasolule oluline ka, et toimuks signaali ülekanne ColS'lt ColR'le, testisin D51A asendusmutatsiooniga ColR'i võimet *colR*-defektse tüve metalliresistentsust komplementeerida. Jooniselt 5 on näha, et muteeritud ColR'i ekspresseeriv tüvi RtacR_{D51A} ei suuda kasvada ei IPTG-ta ega IPTG-ga ZnSO₄, FeSO₄ ja MnCl₂ sisaldavatel söötmetel. Seega ei taasta mutantne ColR_{D51A} *colR*-defektse tüve tsingi- raua- ega mangaanitaluvust ja järelikult on metalliia korral lisaks ColR ja ColS valkudele oluline ka nendevaheline signaaliülekanne.

2.3.2. ColRS süsteemi defektsus mõjutab rohkem Fe²⁺ kui Fe³⁺ tundlikkust

P. putida PaW85 erinevate tüvede rauatundlikkuse määramisel kasutasin raualiia tekitamiseks FeSO₄ lahust, kus raud on oksüdatsiooniastmega +2. Fe²⁺ oksüdeerub aga aeroobsetes tingimustes Fe³⁺-ks. Seda on näha ka raualahuse värvuse muutumisest, sest siirdemetallide lahuste värvus sõltub metalliioonide oksüdatsiooniastmest (Atkins ja Jones, 2008). Seetõttu eeldasime, et FeSO₄ sisaldavas söötmes on Fe²⁺ ioonid oksüdeerunud Fe³⁺ ioonideks ja *colR*- ning *colS*-defektsed tüved on eelkõige tundlikud Fe³⁺ ioonide suhtes. Selle

hüpoteesi kontrollimiseks võrdlesin *P. putida* algtüve ja erinevate *colR*- ja *colS*-defektsete tüvede rauatundlikkust, kasutades söötmete tegemisel umbes ühe kuu vanust FeSO_4 lahust, vahetult enne katset valmistatud FeSO_4 lahust ja FeCl_3 lahust, kus raud on juba algselt oksüdatsiooniastmega +3. Selgus, et ColRS signaaliraja suhtes defektsed tüved on ühtviisi tundlikud uue ja vana FeSO_4 lahuse suhtes, kuid oluliselt vähem tundlikud FeCl_3 suhtes (Joonis 6). Tundlikkuste erinevus ei ole põhjustatud anioonide erinevusest, sest näiteks ZnSO_4 ja ZnCl_2 sisaldaval söötmel kasvavad samad tüved ühtemoodi (tulemusi pole näidatud). Seetõttu näitab antud katse, et vastupidiselt eeldatule on *colR*- ja *colS*-defektsed tüved pigem tundlikud Fe^{2+} suhtes, kuigi ka FeCl_3 sisaldaval söötmel kasvavad *colR*- ja *colS*-defektsed tüved halvemini kui algtüvi.

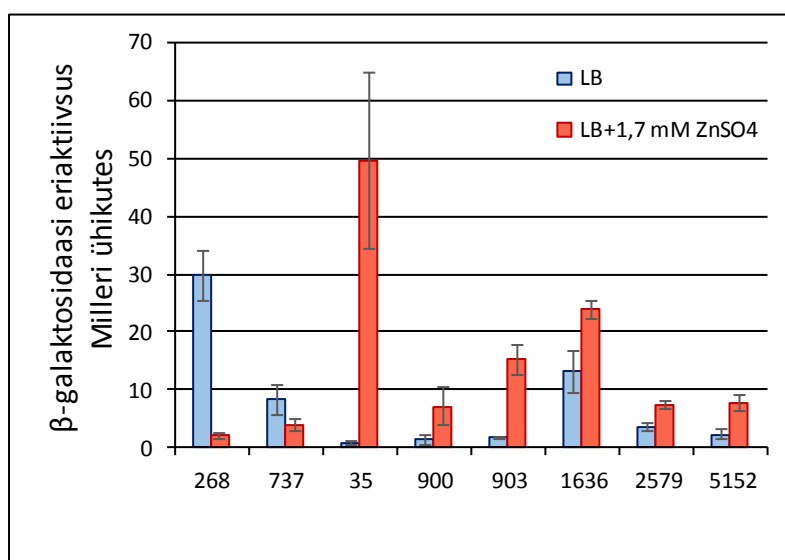


Joonis 6. *P. putida* erinevate tüvede Fe^{2+} ja Fe^{3+} tundlikkuse hindamine. Tüved on tähistatud samamoodi nagu Joonisel 5. Tasse pildistati pärast 20-tunnist kasvamist 30°C juures. Täpis oli külvihetkel ligikaudu 5000 rakku.

2.3.3. Tsink mõjutab *P. putida* ColR-reguleeritavate geenide promootorite aktiivsust läbi ColRS signaaliraja

Arvestades ColRS süsteemi vajalikkust *P. putida* tsingi-, raua- ja mangaanitaluvuses püstitasime hüpoteesi, et nende metallide liig aktiveerib ColRS signaaliraja, mis viib ColR reguloni geenide ekspressiooni muutumisele ja metallilias vajalike valkude sünteesile. *P. putida*'s on teada umbes kümmekond geeni, mille transkriptsiooni ColR reguleerib (Kivistik jt., 2009). Nende geenide transkriptsioonitaset on võimalik hinnata geenide promootorite aktiivsuse järgi, mida omakorda saab määrata β -galaktosidaasi eriaktiivsusega (Kivistik jt., 2009; Kivistik jt., 2006). Selleks, et selgitada, kas metallide liig võib mõjutada ColR reguloni

geenide ekspressiooni, testisin esmalt tsingiliia mõju ColR-reguleeritavate geenide transkriptsioonitasemele. Määrasin β -galaktosidaasi eriaktiivsuse abil ColR-reguleeritavate geenide promootoraktiivsused nii tavalises LB kui 1,7 mM ZnSO_4 sisaldavas LB söötmes kasvanud algtüve rakkudes. Tulemused näitasid, et tsingiliia korral on *P. putida* algtüves ColR-reguleeritavate promootorite aktiivsus selgelt muutunud (Joonis 7). Tsingiliig repressseerib välismembraani valke kodeerivate geenide PP0268 ja PP0737 promootoreid ja aktiveerib geenide PP0035, PP0900, PP0903, PP1636, PP2579 ja PP5152 (geenide kodeeritud valkude kohta vt Tabel 4) promootoreid (Joonis 7). Kuna PP0268 ja PP0737 transkriptsioon on teadaolevalt ColR'i poolt repressseeritav ja teiste geenide ekspressioon ColR'ga aktiveeritav (Kivistik jt., 2006; Kivistik jt., 2009), siis viitavad saadud tulemused ColR'i osalusele nende geenide tsinksõltuval repressioonil/aktivatsioonil.



Joonis 7. ColR-reguleeritavate geenide promootoraktiivsused mõõdetuna β -galaktosidaasi eriaktiivsuse kaudu. Erinevate promootorite testplasmide sisaldavad *P. putida* algtüve rakud kasvasid LB söötmes, millele kas polnud või oli lisatud 1,7 mM ZnSO_4 . Esitatud on vähemalt kolme katse keskmised koos 95% usalduspiiridega.

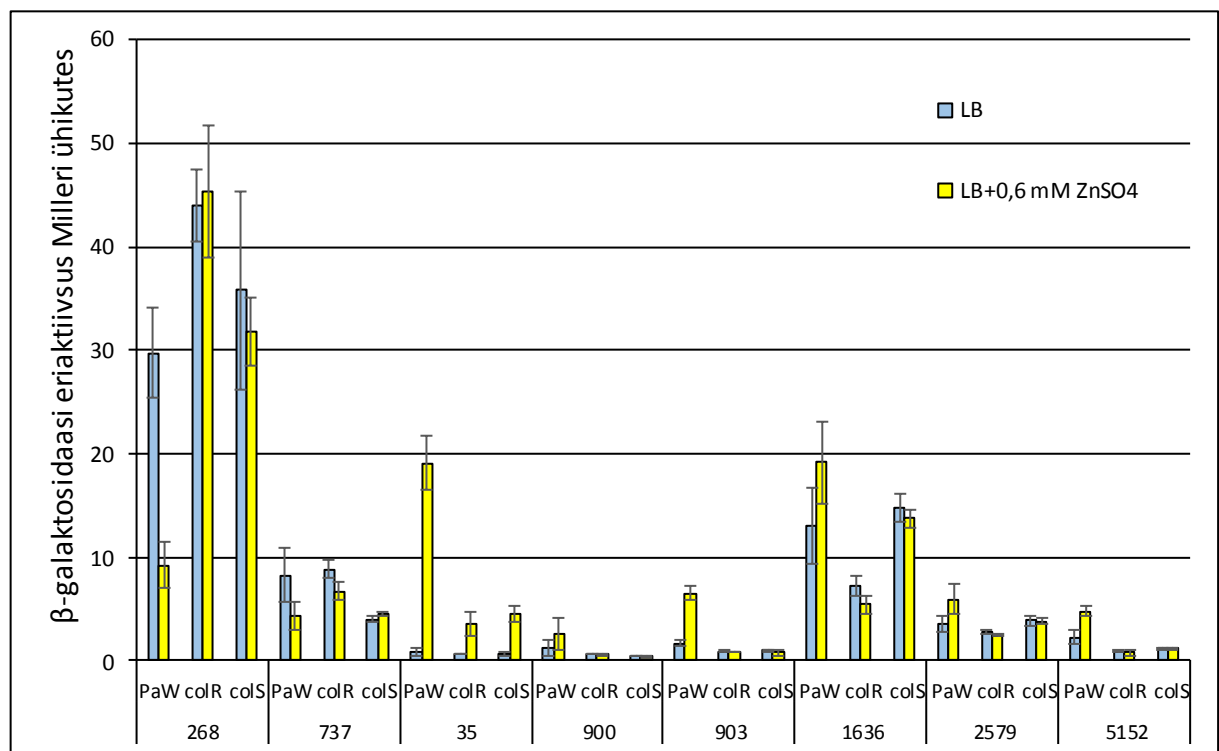
Lisaks eespool mainitud kaheksale promootorile testisin tsingi mõju ka teistele varasemalt ColR reguloni ennustatud geenide promootoritele (Kivistik jt., 2009). Selgus, et geenide PP0036, PP1288, PP1915, PP2560, PP2561 ja PP3766 promootorite aktiivsusi tsink ei mõjutanud (tulemusi pole näidatud), mis viitab, et ColR reguloni ennustus sisaldab ka mitmeid valepositiivseid geene.

Tabel 4. Käesolevas töös analüüsitud ColR-reguleeritavad geenid *P. putida*'s.

Geen/ operon	Kodeeritav valk (lokalisatsioon*)	Oletatav ülesanne rakus	ColR'i mõju ekspressioonile (viide)
PP0035 PP0034 PP0033	GtrA perekonna valk (SM) fosfaat-L-Ara4FN transferaas ArnC (SM) 4-amino-4-deoksü-L-arabinoosi transferaas ArnT (SM)	lipopolüsahhariidide (LPS'de) süntees LPS'de modifitseerimine	aktiveerib (Kivistik jt., 2009)
PP0268	poriin OprE3 (VM)	?	represseerib (Kivistik jt., 2006)
PP0737	lipiid A 3-O-deatsülaas PagL (VM)	LPS'de modifitseerimine	represseerib (Kivistik jt., 2009)
PP0900	PAP2 perekonna valk (SM)	fosfolipiidide metabolism	aktiveerib (Kivistik jt., 2009)
PP0903 PP0904 PP0905	metüültransferaas (TP) LPS'i kinaas InaA (TP) hüpoteetiline valk (SM)	LPS'de metabolism LPS'de modifitseerimine ?	aktiveerib (Kivistik jt., 2009)
PP1636	diatsüülglütserooli kinaas DgkA (SM)	fosfolipiidide metabolism	aktiveerib (Kivistik jt., 2009)
PP2579	fosfoetanoolamiini transferaas CptA (SM)	LPS'de modifitseerimine	aktiveerib (käesolev töö)
PP5152 PP5151	konserveerunud hüpoteetiline valk (SM) hüpoteetiline valk (?)	? ?	aktiveerib (käesolev töö)

* VM – välismembraan, SM – sisemembraan, TP – tsütoplasma

Selleks, et kindlaks teha, kas testitud promootorite transkriptsioonitaseme tsinksõltuv regulatsioon vajab ColRS signaalirada, mõõtsin nendelt promootoritelt lähtuvat transkriptsiooni ka ZnSO₄ sisaldavas söötmes kasvanud *colR*- ja *colS*-defektsetes tüvedes. Kuna ColRS süsteemi suhtes defektsed tüved on tsingi suhtes tundlikumad ja ei suuda kasvada 1,7 mM ZnSO₄ juuresolekul, siis kasvasin selles katses baktereid 0,6 mM ZnSO₄ sisaldusega söötmes. Selgus, et ka 0,6 mM ZnSO₄ mõjutab testitud promootorite aktiivsusi algtüves, kuigi vähemal määral kui 1,7 mM (võrdle algtüve väärtusi joonisel 7 ja 8). Samas ei mõjutanud kasvukeskkonda lisatud tsink promootorite aktiivsusi *colR*- ja *colS*-defektsetes tüvedes (Joonis 8). Vaid PP0035 geeni promootor aktiveerus vastusena tsingile ColRS süsteemist sõltumatult, kuid see muutus ei ole *colR*- ja *colS*-defektsetes tüvedes nii suur, nagu algtüves (Joonis 8). Järelikult vajab analüüsitud promootorite tsinksõltuv aktivatsioon/repressioon funktsionaalset ColRS signaalirada.

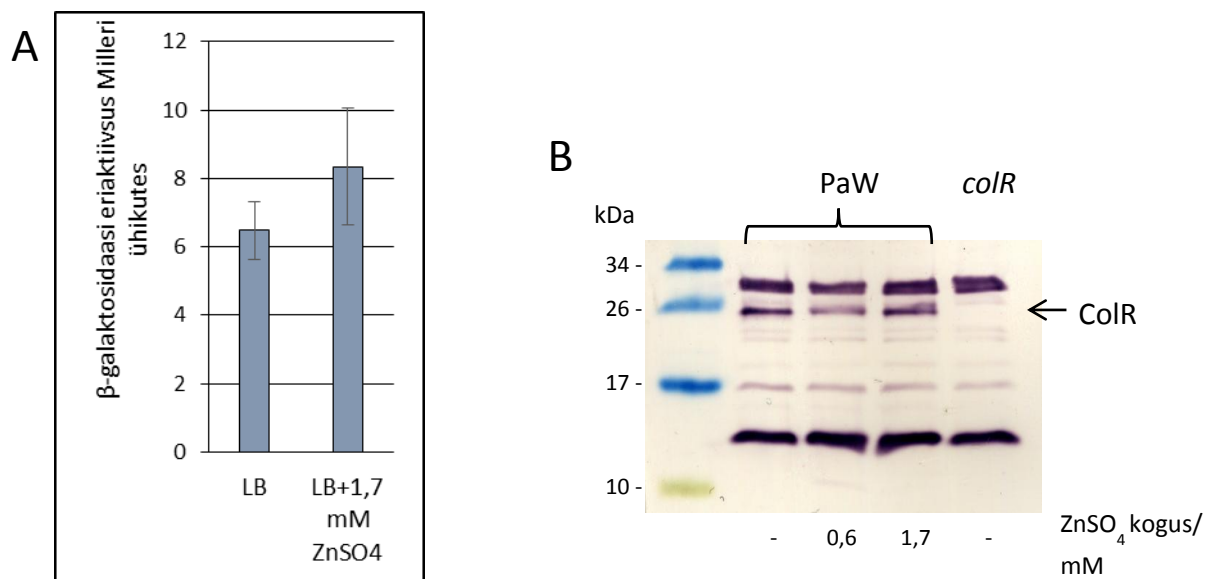


Joonis 8. ColR-reguleeritavate promootorite aktiivsused *P. putida* algtüves PaW85 ja *colR*- ning *colS*-defektsetes tüvedes. Erinevate promootorite testplasmide sisaldavad *P. putida* algtüve rakud kasvasid LB söötmes, millele kas polnud või oli lisatud 0,6 mM ZnSO₄. Esitatud on vähemalt kolme katse keskmised koos 95% usalduspiiridega.

2.3.4. Tsingiliig ei muuda *colRS* operoni ekspressiooni ega ColR valgu hulka rakus

Enamasti reguleerivad kahekomponentsed süsteemid oma märklaudgeene seega, et kahekomponentse süsteemi aktiveerumisel toimib fosforüleeritud regulaatorvalk efektiivsema transkriptsiooni regulaatorina kui mittefosforüleeritud valk. Samas võib tingimustes, kus kahekomponentne süsteem on vajalik, suurenda ka teda ennast kodeerivate geenide ekspressioon (Perron jt., 2004) ja ka fosforüleerimata regulaatorvalk võib mõjutada geenide transkriptsioonitaset, kui teda on rakus suures koguses (Kivistik jt., 2009). *colRS* operoni kohta on teada, et operoni ees paikneb ColR'i seondumisjärjestus (Kivistik jt., 2009) ja kuigi varasemad katsed ei ole näidanud, et ColR toimiks autoregulaatorina, kontrollisin siiski, kuidas muutub ColR valgu enda kogus tsingiliia korral. Selleks kasutasin kahte meetodit: *colRS* operoni promootori aktiivsuse määramist β-galaktosidaasi eriaktiivsusega ja ColR valgu koguse hindamist Western blot meetodiga. Promootoraktiivsuste võrdlus näitas, et 1,7 mM ZnSO₄ juuresolekul kasvanud rakkudes ei ole *colR* geeni ekspressioon oluliselt suurem, kui tavalises söötmes kasvanud rakkudes, mis viitab, et tsingiliig ei indutseeri *colRS* operoni

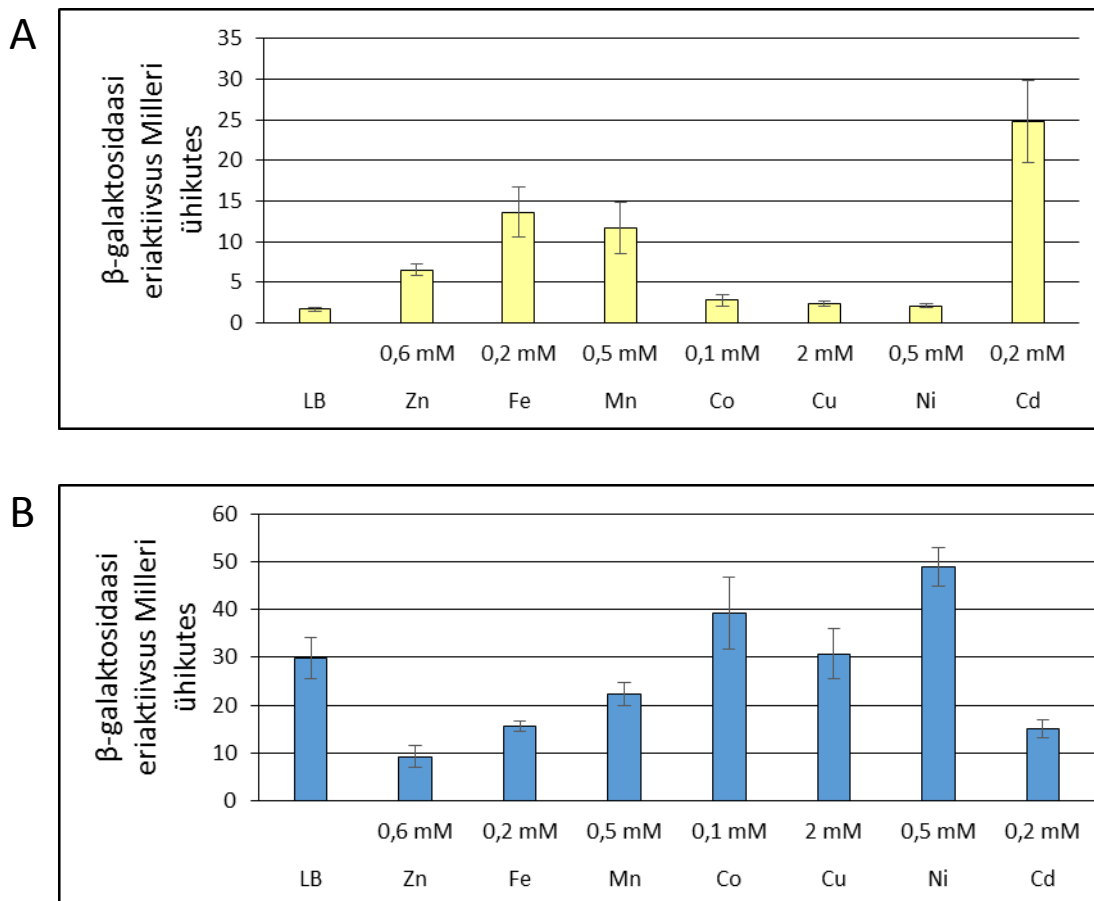
(Joonis 9A). Ka ColR valgu koguse hindamine Western blot meetodiga näitas, et ColR valgu hulk ei sõltu tsingi kogusest kasvukeskkonnas (Joonis 9B). Järelikult, kuna tsingiliias ColR valgu hulk rakkudes ei suurene, peab ColR-reguleeritavate geenide transkriptsioonitaseme muutus olema põhjustatud sellest, et tsingiliig aktiveerib ColRS signaaliraja.



Joonis 9. Tsingiliia mõju *colR* promootori ekspressioonile (A) ja ColR valgu hulga (B). A. *colR* geeni promootoraktiivsused tavalises LB ja 1,7 mM ZnSO₄ sisaldavas LB söötmes kasvanud *P. putida* algtüve PaW85 rakkudes. Esitatud on kolme katse keskmised koos 95% usalduspiiridega. B. Western blot ColR'i vastaste antikehadega. Koguvalk eraldati tavalises LB söötmes, 0,6 mM ZnSO₄ sisaldavas ja 1,7 mM ZnSO₄ sisaldavas LB söötmes kasvanud *P. putida* algtüve rakkudest. Kontrolliks kasutati *colR*-defektsest tüvest eraldatud koguvalku. 12,5% SDS-PA geelile on kantud 7 µg valku.

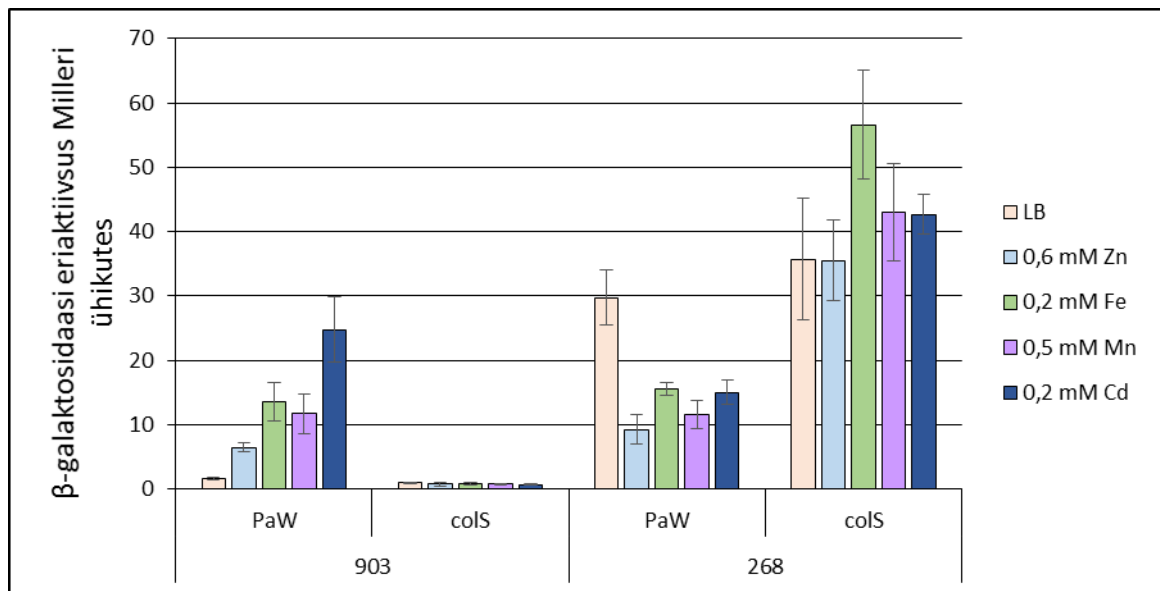
2.3.5. Lisaks tsingile mõjutavad ColR-reguleeritavate promootorite aktiivsust ka raud, mangaan ja kaadmium

Kuna *P. putida colR*- ja *colS*-defektsed tüved on lisaks tsingile tundlikumad ka raua ja mangaani suhtes (Joonis 5), siis testisin, kas ka need või mõni muu metall, võiksid ColRS signaalirada aktiveerida. Selleks mõõtsin ColR-aktiveeritava PP0903 ja ColR-represseeritava PP0268 promootori aktiivsusi erinevaid metalle sisaldavates söötmetes kasvanud rakkudes. Selgus, et *P. putida* algtüves suurendavad PP0903 geeni promootorilt lähtuvat transkriptsiooni lisaks tsingile ka raud, mangaan ja kaadmium (Joonis 10A). Samas aga koobalt, vask ja nikkel PP0903 promootori aktiivsust ei mõjuta. Sarnase tulemus sain ColR-represseeritava PP0268 promootoriga, mille aktiivsus vähenes tsingi-, raua-, mangaani- ja kaadmiumiilingimustes (Joonis 10B). Koobalti, vase ja nikli puhul selle promootori repressiooni ei täheldatud.



Joonis 10. PP0903 (A) ja PP0268 (B) geenide promootoraktiivsused erinevate metallide liias kasvanud *P. putida* algtüve PaW85 rakkudes. Mõlema geeni promootoraktiivsused mõõdeti tavalises LB söötmes ja 0,6 mM ZnSO₄, 0,2 mM FeSO₄, 0,5 mM MnCl₂, 0,1 mM CoCl₂, 2 mM CuSO₄, 0,5 mM NiSO₄ ja 0,2 mM CdSO₄ sisaldavas LB söötmes kasvanud rakkudest. Mõlemal joonisel on esitatud vähemalt nelja katse keskmised väärtused koos 95% usalduspiiridega.

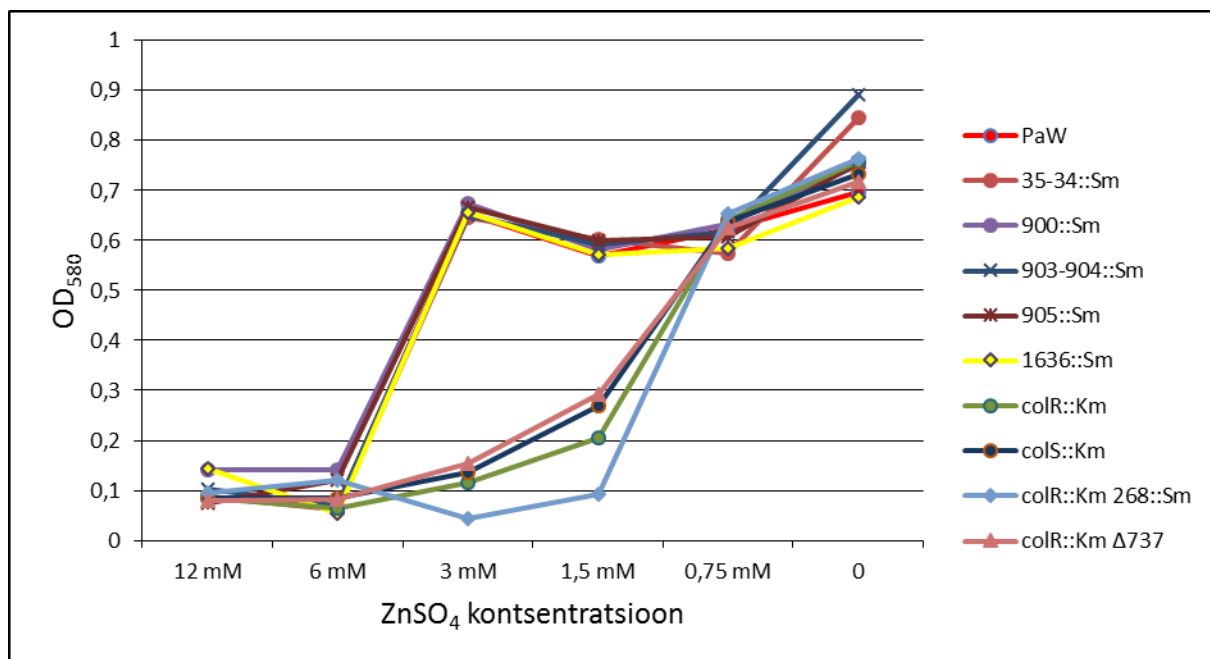
Selleks, et kontrollida, kas raud, mangaan ja kaadmium mõjutavad PP0903 ja PP0268 promootoreid ColRS signaaliraja kaudu, võrdlesin nende promootorite aktiivsusi 0,2 mM FeSO₄, 0,5 mM MnCl₂ ja 0,2 mM CdSO₄ juuresolekul kasvanud algtüve ja *colS*-defektse tüve rakkudes. Ilmnes, et erinevalt algtüvest PaW85 ei mõjuta ükski metall *colS*-defektses tüves ei PP0903 ega PP0268 promootori aktiivsust (Joonis 11), mis näitab, et nii tsink, raud, mangaan kui kaadmium mõjutavad nende geenide transkriptsiooni läbi ColRS signaaliraja. Kuna ColR valgu kogus metalliliias ei suurene (tsingi kohta Joonis 9B, teiste metallide tulemusi pole näidatud), siis viitab see, et ColRS süsteemi aktiveerivad nii tsingi-, raua-, mangaani- kui ka kaadmiumiioonid.



Joonis 11. PP0903 ja PP0268 promootoraktiivsused *P. putida* algtüves PaW85 ja *colS*-defektses tüves. Mõlema geeni promootoraktiivsused mõõdeti ilma metallisoolata ja 0,6 mM ZnSO₄, 0,2 mM FeSO₄, 0,5 mM MnCl₂ ning 0,2 mM CdSO₄ sisaldavas LB söötmes kasvanud rakkudest. Esitatud on vähemalt nelja katse keskmised koos 95% usalduspiiridega.

2.3.6. Ükski teadaolev ColR-reguleeritav geen pole üksinda vastutav ColRS süsteemi defektsete rakkude suurema tsingitundlikkuse eest

Nagu eespool näidatud reguleerib ColRS süsteem metalliiliast sõltuvalt kaheksa geeni/operoni ekspressiooni (Joonis 8 ja Tabel 4). Selleks, et kindlaks teha, kas ja millised neist geenidest võiksid olla *P. putida*'le vajalikud metalliilia tingimustes, võrdlesin erinevate ColR-reguleeritavate geenide suhtes defektsete *P. putida* tüvede ZnSO₄ taluvusi. Eeldasin, et ColR-aktiveeritavate geenide katkestamine algtüves võiks vähendada bakteri tsingitaluvust ja ColR-represseeritavate geenide katkestamine *colR*-defektses tüves võiks suurendada selle tüve metallitaluvust. Kasutades bakterite kasvatamist kahekordse ZnSO₄ lahjendusastmega LB söötmetes sain tulemused, mis näitasid, et ükski neist geenidest ei mõjuta oluliselt rakkude tsingitundlikkust (Joonis 12). Ei PP0900, PP0905, PP1636 katkestamine ega PP0035-PP0034 ja PP0903-PP0904 topeltkatkestamine vähendanud algtüve rakkude tsingitaluvust. Samuti ei suurenenud *colR*-defektse tüve tsingitaluvus, kui katkestatud oli PP0268 või deleteeritud PP0737 geen (Joonis 12). Ka PP2579 deleteerimine või PP5152 katkestamine ei mõjutanud algtüve tsingitundlikkust (Tabel 5).



Joonis 12. ColR-reguleeritavate geenide suhtes defektsete tüvede ZnSO₄ taluvused. Rakud kasvasid enne optilise tiheduse mõõtmist 30°C juures 24 tundi. Joonisel on ühe katse tulemused.

Kuna ühelgi geenil üksikult ega ka kahel samasse operoni kuuluva geeni topeltmutandil ei olnud mõju tsingitundlikkusele, siis oletasime, et *colR*- ja *colS*-defektsete tüvede metallitundlikkuse suurenemine võib olla põhjustatud mitme geeni koosmõjust. Seetõttu konstrueeriti samaaegselt mitme ColR-reguleeritava geeni või operoni suhtes defektsed tüved (vt Lisa 1) ja võrreldi nende tsingitundlikkusi. Kasutades väiksemate ZnSO₄ kontsentratsioonide vahedega söötmeid, selgus, et tüved, kus on deleteeritud kolmest geenist koosnev PP0035-PP0034-PP0033 operon, on tsingi suhtes natuke tundlikumad kui algtüvi (Tabel 5), kuid see pole võrreldav *colR*-defektse tüve tugevalt vähenenud tsingitaluvusega. PP0900, PP0903-PP0905, PP2579 ja PP5152 geenide puudumine lisaks mõne teise ColR-reguleeritava geeni defektsusele tsingitundlikkust ei vähendanud (Tabel 5). Seega ei vastuta *colR*- ja *colS*-defektsete tüvede tsingitundlikkuse suurenemise eest ükski teadaolev ColR-reguleeritav geen üksinda ja ka mitmel geenil korraga ei ole suurt mõju tsingitaluvusele.

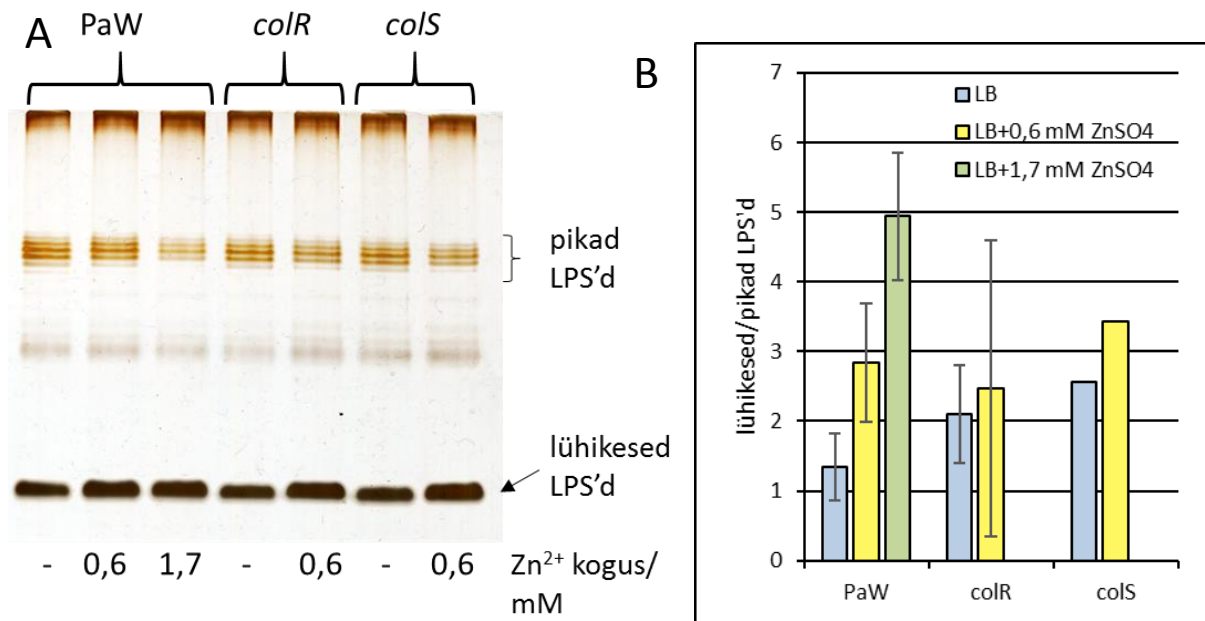
Tabel 5. *P. putida* ColR reguloni geenide suhtes defektsete tüvede tsingitundlikkused. Esitatud on minimaalne ZnSO₄ kontsentratsioon, mille korral vastavad tüved enam LB söötmes kasvada ei suuda. 24 tundi 30°C juures kasvanud rakukultuuri optiline tihedus määrati lainepikkusel 580 nm.

Katkestatud või deleteeritud geenidega tüvi	Zn ²⁺ MIC* (mM)	katsete arv
<i>P. putida</i> algtüvi PaW85	4	2
35-33	3,5	2
900	4	1
903-905	4	1
2579	4	1
35-33, 900	3,5	3
35-33, 903-905	3,5	1
35-33, 2579	3,5	2
903-905, 2579	4	1
35-33, 903-905, 2579	3,5	2
35-33, 903-905, 2579, 900	3,5	1
35-33, 903-905, 2579, 5152	3,5	2

*MIC – minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon

2.3.7. Tsingiliia korral muutub erineva ahelapikkusega lipopolüsahhariidide suhe, aga mitte muster

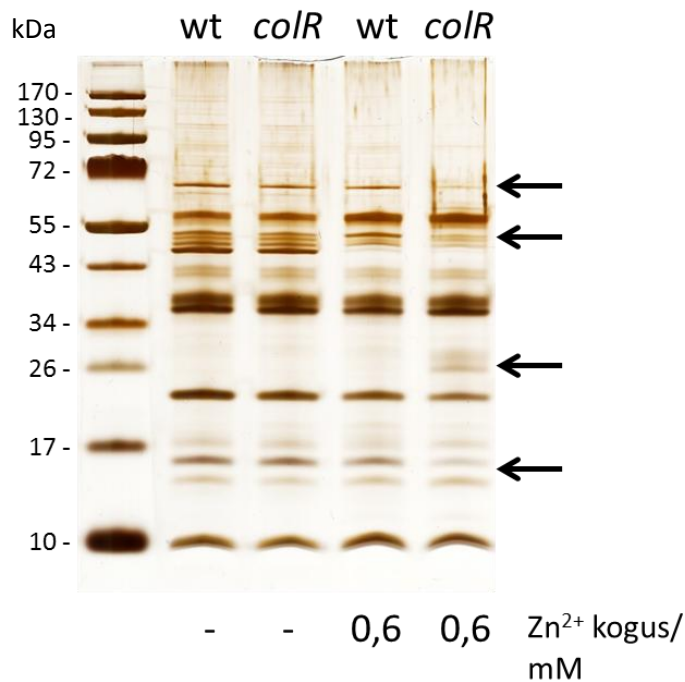
Metalliliia paremaks talumiseks võivad bakterid modifitseerida välismembraani lipopolüsahhariide (Nishino jt., 2006). Kuna *Xanthomonas citri* subsp. *citri*'s on leitud, et ColRS süsteem puudumisel väheneb pikaahelaliste LPS'ide süntees (Yan ja Wang, 2011) ja kuna ka mitmed *P. putida* ColR-reguleeritavad geenid kodeerivad oletatavalt LPS'ide sünteesis osalevaid valke (Tabel 4), siis analüüsisin, kuidas muutub *P. putida* rakkude LPS'ide muster tsingiliia korral ja kas see on seotud ColRS signaalirajaga. Selgus, et *P. putida* algtüves PaW85 ei erine LPS'ide muster tsingiliias ja tavatingimustes ning samuti pole erinevusi algtüve ja *colR*- ning *colS*-defektse tüve LPS'ide mustrites (Joonis 13A). Samas on nii algtüves kui ka ColRS süsteemi suhtes mutantsetes tüvedes näha, et tsink muudab erineva suurusega LPS'ide omavahelist suhet. Tsingiliias kasvanud rakkudel on suhteliselt vähem pikki ja rohkem lühikesi lipopolüsahhariidi molekule (Joonis 13). Seega, ei muutu *P. putida* rakkudes vastusena tsingi liiale LPS'ide muster, kuid muutub pikkade ja lühikeste lipopolüsahhariidide suhe ja ColRS signaalirada ei ole nendes tingimustes lipopolüsahhariidide sünteesiga nähtavalt seotud.



Joonis 13. *P. putida* algtüve PaW85 ning *colR*- ja *colS*-defektsete tüvede LPS'de mustrid (A) ja lühikeste ning pikkade LPS'ide suhe (B). A. Algtüve LPS'd on eraldatud nii tavalises LB söötmes, kui 0,6 mM ja 1,7 mM ZnSO₄ juuresolekul kasvanud rakkudest ja *colR*- ning *colS*-defektsete tüvede LPS'd tavalises LB ja 0,6 mM ZnSO₄ sisaldavas LB söötmes kasvanud rakkudest. B. Lühikeste ja pikaahelaliste LPS'ide suhte määramiseks on vastavad LPS'i hulgad kvantiteeritud kasutades ImageQuant programmi. Algtüve ja *colR*-defektse tüve LPS'ide suhete arvutamisel on kasutatud vähemalt kolme geelipildi andmeid ja esitatud on 95% usalduspiirid, *colS*-defektse tüve suhted on saadud kasutades joonisel A esitatud geelipilti.

2.3.8. *colR*-defektse tüve tsingilias kasvanud rakkude välismembraani valguline koostis erineb algtüvest

Varasemast on teada, et *P. putida*'s on ColRS süsteem tõenäoliselt vajalik membraani struktuuri ja eelkõige välismembraani valgulise homöostaasi kontrollimiseks (Kivistik jt., 2009; Putrinš jt., 2011). Seetõttu testisin, milline on tsingilias kasvanud rakkude välismembraani valgumuster ja kas on erinevusi algtüve ning *colR*-defektse tüve välismembraani valgulises koostises. Tulemused näitasid, et LB söötmes kasvades on algtüve ja *colR*-defektse tüve välismembraani valgumuster samasugune (Joonis 14). Tsingilias on aga nii algtüve kui *colR*-defektse tüve välismembraani valguline koostis mõnevõrra muutunud. Lisaks sellele erineb tsingi juuresolekul kasvanud *colR*-defektsete rakkude välismembraani valgumuster mitmete valkude osas algtüve omast. See viitab, et ilmselt on ColRS süsteem tsingilias vajalik osade välismembraanivalkude ekspressiooni reguleerimisel.



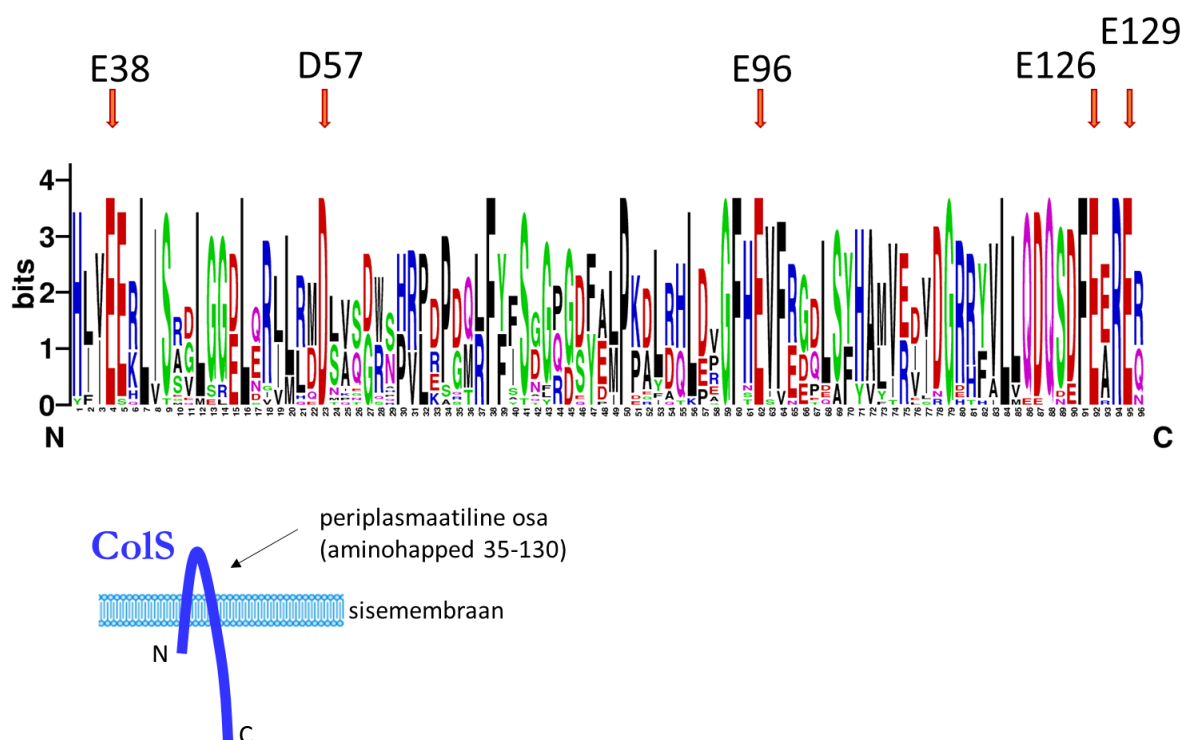
Joonis 14. *P. putida* algtüve PaW85 (wt) ja *colR*-defektse tüve välismembraani valgumustrid. Valgud on eraldatud tavalises LB ja 0,6 mM ZnSO₄ sisaldavas LB söötmes kasvanud rakkudest. Geelile kanti 0,5 µg valku. Nooltega on tähistatud erinevused tsiingi juuresolekul kasvanud algtüve ja *colR*-defektse tüve valgumustris.

2.3.9. ColS-i periplasmaatilises osas on neli konserveerunud glutamiinhapet ja üks asparagiinhape

Valkudes osalevad metalliioonide sidumises kindlad aminohapped. Kuna metalliioonid on positiivse laenguga, siis on nendeks aminohapeteks sageli glutamiinhape ja asparagiinhape, mille kõrvalahelad on neutraalse pH juures negatiivse laenguga, ja histidiin, mis sisaldab vaba elektronpaariga lämmastiku aatomit (Ma jt., 2009). Gramnegatiivsete bakterite membraanis paiknevate kahekomponentsete süsteemide sensorvalkudes on enamasti signaali äratundvaks osaks valgu periplasmasse jääv osa ja juhul, kui signaaliks on metalliioonid, toimub signaali äratundmine metalliiooni sidumisega (Wösten jt., 2000).

P. putida ColRS signaaliraja sensorvalgul ColS on üks periplasmaatiline osa, mis koosneb 96 aminohappest (Joonis 15). Nende 96 aminohappe hulgas on viis histidiini (H), kaksteist asparagiinhapet (D) ja kaheksa glutamiinhapet (E). Et selgitada, millised neist aminohapetest on kõige konserveerunud, joondati täielikult sekveneeritud genoomidega pseudomonaadide ColS valkude (www.pseudomonas.com) periplasmaatiliste osade valgujärjestused. Kolmekümne seitsme sekveneeritud genoomiga pseudomonaadi ColS valgu võrdlus näitas, et ColS-i periplasmaatilises osas on neli täielikult konserveerunud glutamiinhapet positsioonides 38, 96, 126 ja 129 ning üks asparagiinhape positsioonis 57 (Joonis 15). Kui eeldada, et *P. putida* ColS valk on metallisensor ja ColRS signaalirada on

kõikides pseudomonaadides sarnase funktsiooniga, siis võiksid need viis aminohapet osaleda metalliioonide sidumises.

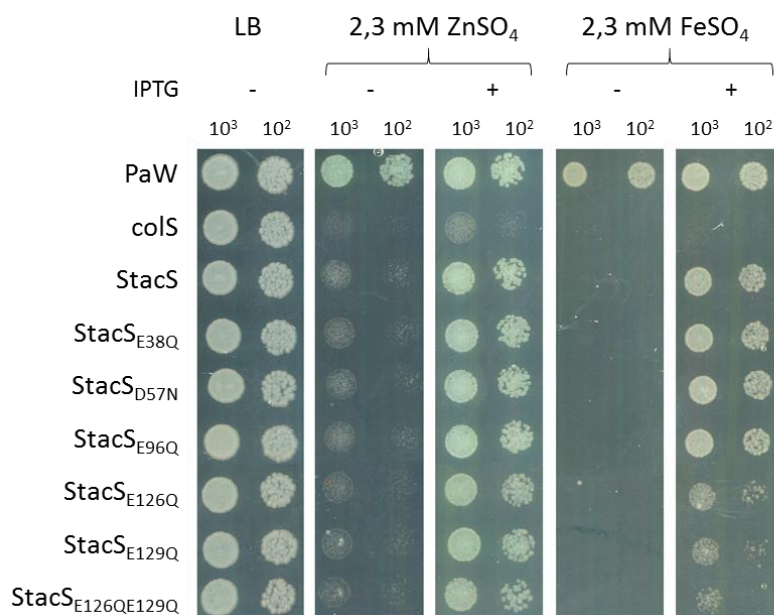


Joonis 15. Kolmekümne seitsme pseudomonaadi ColS valkude periplasmaatiliste osade võrdlus. Nooltega on tähistatud täielikult konserveerunud glutamiinhapped positsioonides 38, 96, 126 ja 129 ja asparagiinhape positsioonis 57. Abijoonisel on skemaatiliselt kujutatud ColS oletatav asetus sisemembraanis.

2.3.10. ColS'i periplasmaatilise osa konserveerunud glutamiinhapete või asparagiinhappe asendamine ei mõjuta *P. putida* tsiingitundlikkust, kuid E126 ja E129 asendus vähendab rauataluvust

Selleks, et testida, kas neli ColS'i periplasmaatilises osas asuvat konserveerunud glutamiinhapet ja üks asparagiinhape võiksid osaleda metalliioonide sidumises, konstrueeriti esmalt *colS*-defektsed tüved, mis sisaldavad IPTG-ga indutseeritavalt tac promootorilt ekspresseeruvat mutatsiooniga *colS* geeni. ColS'i 38, 96, 126 või 129 positsioonis paiknev glutamiinhape asendati glutamiiniga (Q) (tüved StacS_{E38Q}, StacS_{E96Q}, StacS_{E126Q} ja StacS_{E129Q}) ja 57 positsiooni asuv asparagiinhape asendati asparagiiniga (N) (StacS_{D57N}). Kui need konserveerunud glutamiinhapped ja asparagiinhape seovad metalliioone negatiivse laengu abil, siis peaks nende asendamisel vastavate hapete amiididega ColS'i funktsionaalsus kaduma ja mutatsiooniga ColS valku sisaldavad rakud olema tsiingi, raua ja mangaani suhtes tundlikumad kui algtüvi või induktsiooni tingimustes kasvav StacS tüvi. Ilma mutatsioonita ja

mutatsiooniga ColS valku sisaldavate tüvede võrdlus ZnSO_4 sisaldaval LB söötmel näitas, et nii asendusmutatsiooniga kui algset ColS valku ekspresseerivad rakud kasvavad tsingiliias võrdselt hästi (Joonis 16). Järelikult ei mõjuta ühe glutamiinhappe või asparagiinhappe muteerimine ColS'i võimet tunda ära tsingiliiga. Samade tüvede kasvu võrdlus FeSO_4 sisaldaval LB söötmel näitas aga, et tüved, mis ekspresseerivad ColS_{E126Q} või ColS_{E129Q} on raua suhtes natuke tundlikumad kui algset ColS'i ekspresseerivad tüved (Joonis 16). Teiste glutamiinhapete ega asparagiinhappe asendus rauatundlikkust ei mõjutanud.



Joonis 16. Erinevate *colS*-defektsete tüvede kasv tavalisel LB ning 2,3 mM ZnSO_4 ja FeSO_4 sisaldaval LB söötmel. Tüved on tähistatud järgmiselt: PaW – algtüvi PaW85; *colS* – *colS*-defektne tüvi; StacS – *colS*-defektne tüvi, millesse on viidud tac promootorilt ekspresseeritav *colS* geen; StacS_{E38Q}, StacS_{D57N}, StacS_{E96Q}, StacS_{E126Q} ja StacS_{E129Q} – *colS*-defektsed tüved, millesse on viidud tac promootorilt ekspresseeritav mutatsiooni E38Q, D57N, E96Q, E126Q või E129Q kandev *colS* geen; StacS_{E126QE129Q} – *colS*-defektne tüvi, millesse on viidud tac promootorilt ekspresseeritav mutatsioone E126Q ja E129Q kandev *colS* geen. Tulpade kohal on ligikaudne rakkude arv täpis külvihetkel. Tasse pildistati pärast 20-tunnist kasvamist 30°C juures.

Kuna E126Q ja E129Q üksikmutatsioonid vähendasid vaid osaliselt ColS valgu sensorfunktsiooni raua suhtes, siis kontrollisin ka hüpoteesi, et 126. ja 129. positsiooni glutamiinhapped koos on vajalikud rauaiooni tajumiseks. Konstrueerisin E126Q ja E129Q topeltmutatsiooni kandva tüve StacS_{E126QE129Q} ja analüüsisin selle tüve kasvu FeSO_4 sisaldaval söötmel. Jooniselt 16 on näha, et StacS_{E126QE129Q} tüvi kasvab FeSO_4 ja IPTG-d sisaldaval tassil veidi halvemini kui StacS_{E126Q} ja StacS_{E129Q} tüved, kuid siiski paremini kui

colS-defektne tüvi. See viitab, et positsioonide 126 ja 129 glutamiinhapped koos osalevad raualiia tunnetamises, aga tõenäoliselt osaleb lisaks neile kahele aminohappele selles veel ka mõni teine aminohape.

2.4. Arutelu

Varasemad uuringud viitavad, et ColRS signaalirada on bakterites seotud mitmesuguste protsessidega. Pseudomonaadides on ColRS süsteem oluline nii taimejuurtel kasvades (Dekkers jt., 1998; Ramos-Gonzalez jt., 2005), välismembraani struktuuri kontrollimisel (Kivistik jt., 2009; Putrinš jt., 2011), virulentsuse tagamisel (Garvis jt., 2009; Gutu jt., 2013) kui ka metallilii talumisel (Hu ja Zhao, 2007). Samas ei olnud senini teada, mis tingimustes see signaalirada aktiveerub. Käesolev töö näitab, et ColRS signaalida aktiveerub metallilii ja kaitses *P. putida*'t tsingi-, raua- ja mangaanilii tingimustes.

2.4.1. Tsink, raud, mangaan ja kaadmium aktiveerivad *P. putida* PaW85 tüve ColRS signaaliraja, mis on vajalik tsingi-, raua- ja mangaanilii talumiseks

P. putida PaW85 erinevate tüvede kasvu võrdlemisel metallisooli sisaldavatel söötmetel selgus, et ColRS süsteem on vajalik tsingi-, raua- ja mangaanilii, kuid mitte vase-, koobalti-, nikli- või kaadmiumilii tingimustes (Joonis 5). Need tulemused on üldiselt kooskõlas kirjanduslike andmetega, sest ColRS süsteemi vajalikkust metallilii tingimustes on näidatud varem ka teistes bakteriliikides (Hu ja Zhao, 2007; Zhang jt., 2008; Yan ja Wang, 2011). Samas on käesolevas töös saadud tulemused varem publitseeritutest mõneti erinevad, sest kui *P. putida* tüvele CD2 on ColRS signaalirada oluline eelkõige Mn^{2+} lii korral, aga ka Cd^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} ja Pb^{2+} talumisel (Hu ja Zhao, 2007), siis *P. putida* PaW85 vajab ColRS süsteemi vaid Zn^{2+} , Fe^{2+}/Fe^{3+} ja Mn^{2+} lii tingimustes. Kuna *P. putida* CD2 on isoleeritud kui kaadmiumiresistentne tüvi (Hu ja Zhao, 2007), siis on oodatav, et ta erineb metallitaluvuse osas PaW85 tüvest. CD2 tüvi talub LB tardsöötmetel kasvades vähemalt kaks, Co^{2+} osas koguni 20 korda suuremaid metallikontsentratsioone kui PaW85 tüvi ja seega on need tüved juba algselt erineva metallitaluvusega. See on arvatavasti põhjuseks, miks ColRS süsteemi puudumise efekt on osade metallide puhul suurem CD2 tüves. Samas on nende tüvede ColR valgud 100% ja ColS valgud 97% identsed, mistõttu metallitaluvuse erinevus ei ole ilmselt seotud ColRS süsteemiga. ColRS süsteemi vajalikkust metallilii talumisel on näidatud ka *Xanthomonas*'e perekonna liikides. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*'le on ColRS süsteem vajalik Cu^{2+} talumisel (Yan ja Wang, 2011) ja *X. campestris* patovar *campestris*'le Cd^{2+} talumisel (Zhang jt., 2008). Teiste metallide liias ei ole antud liikide ColRS süsteemide vajalikkust uuritud, mis ei võimalda ka nende võrdlust *P. putida*'s saadud tulemustega. Kuna *Xanthomonas* perekonna liikide ColS valkude periplasmaatilised osad on väga erinevad *P.*

putida ColS valgu omast, siis ei oleks üllatav, kui neil oleks rakkudes erinevad rollid ja erinev spetsiifika metallitaluvuse osas.

Kaheksa ColR reguloni geeni promootori aktiivsuse määramine näitas, et tsingi-, raua-, mangaani- ja kaadmiumisoolade juuresolekul muutub nende promootorite aktiivsus *P. putida* algtüves PaW85, kuid mitte *colR*- ja *colS*-defektsetes tüvedes (Joonised 8 ja 11), mis viitab, et tsink, raud, mangaan ja kaadmium aktiveerivad ColRS signaaliraja. Samas ei mõjutanud need metallid kõikide, ennustuse kohaselt ColR reguloni kuuluvate geenide promootorite aktiivsusi, mis viitab, et ColR reguloni ennustus (Kivistik jt., 2009) oli ebatäpne ja sisaldas mitmeid valepositiivseid geene. See võib olla tingitud mitmest asjaolust, aga peamine on ilmselt see, et varem ei olnud ColRS süsteemi aktiveeriv signaal teada. Kuna ColR-sõltuvate promootorite aktiivsusi analüüsiti mitteindutseerivates tingimustes, siis oli ColR'i puudumise efekt kõikide promootorite korral oluliselt väiksem, kui ColR'i üleekspressioonimise efekt (Kivistik jt., 2009). Näiteks määrati *in vitro footprint* analüüsiga ColR'i seondumisjärjestused ka geenide PP2560 ja PP3766 ette, mille promootoraktiivsused *colR*-defektses tüves ja algtüves ei erinenud, kuid suurenesid ColR'i üleekspressiooni korral (Kivistik jt., 2009). Samas näitab käesolev töö, et tsingiliig nende ja ka mitme teise ennustuse kohaselt ColR reguloni paigutatud promootori aktiivsusi ei mõjuta. Seetõttu vajab ColR reguloni ennustus edaspidist revideerimist.

Kuigi ka kaadmium aktiveerib ColRS signaaliraja, ei mõjuta ColRS süsteemi puudumine *P. putida* kaadmiumitaluvust (Joonised 5 ja 11). Kaadmium asub perioodilisustabelis tsingiga samas rühmas ja on elektronkatte struktuurilt tsingiga sarnane (Atkins ja Jones, 2008). Seetõttu on võimalik, et kaadmium suudab sarnasuse tõttu tsingile aktiveerida ColRS signaaliraja, kuid läbi ColRS süsteemi toimuv geeniregulatsioon ei ole kaadmiumiresistentsuse tagamisel bakterile oluline või on küll oluline, kuid rakus on kaadmiumi talumiseks mitmeid teisi mehhanisme, mis suudavad ColRS süsteemi puudumist kaadmiumi talumiseks kompenseerida. Headeks kandidaatideks võiksid olla näiteks CzcCBA ja CadA transporterid, mis aitavad pseudomonaadides kaadmiumi taluda. *P. aeruginosa* CzcCBA valgukompleks pumpab rakust välja nii Cd^{2+} kui ka Zn^{2+} ja Co^{2+} ioone ning selle transporteri geenide ekspressiooni reguleerib CzcRS kahekomponentne signaalirada (Perron jt., 2004). CadA on ATP energiat kasutav transporter, mis on *P. putida* 06909 tüvele vajalik kaadmiumi talumiseks ja osaliselt ka tsingili talumiseks (Lee jt., 2001).

2.4.2. PP0035-PP0034-PP0033 operoni deleteerimine mõjutab mõnevõrra *P. putida* tsingitaluvust

Selleks, et selgitada, mis võiks olla ColRS süsteemi suhtes defektsete rakkude metallitaluvuse vähenemise põhjuseks, analüüsisin, kuidas mõjutab teadaolevate ColR-reguleeritavate geenide puudumine rakkude tsingitaluvust. Üllatuslikult selgus, et ühegi geeni deleteerimisel või katkestamisel üksikult ei ole olulist mõju tsingitaluvusele (Joonis 12) ja ka mitme ColR-reguleeritava geeni samaaegsel puudumisel ei muutu rakud nii tsingitundlikuks kui on *colR*-või *colS*-defektse tüve rakud (Tabel 5).

Teadaolevatest ColR-reguleeritavatest geenidest mõjutab tsingitaluvust ainult PP0035-PP0034-PP0033 operoni deleteerimine, kuigi vähesel määral, mis ei selgita ColRS raja defektsuse korral nähtavat tugevat metallitaluvuse vähenemist (Tabel 5). PP0034 ja PP0033 geenide homoloogid *E. coli*'s ja *Salmonella enterica*'s kodeerivad lipopolüsahhariidide modifitseerimises osalevaid ensüüme ArnC ja ArnT. Mõlemad ensüümid on seotud lipopolüsahhariidi lipiid A osale 4-amino-4-deoksü-L-arabinoosi (L-Ara4N) molekuli lisamisega (Breazeale jt., 2005; Trent jt., 2001). *S. enterica*'s on näidatud, et L-Ara4N lisamine lipiid A'le vähendab lipopolüsahhariidi negatiivset laengut ja sellega ka Fe^{3+} ionide seondumist rakupinnale, kaitstes seeläbi rakku raualiia eest (Nishino jt., 2006). ArnC ja ArnT ja ka teiste L-Ara4N lisamisega seotud geenide ekspressiooni reguleerib PmrAB signaalirada (Gunn jt., 1998), mis aktiveerub vastusena Fe^{3+} liiale (Wösten jt., 2000). Võimalik, et ka *P. putida*s kodeerivad PP0034 ja PP0033 geenid lipopolüsahhariidide modifitseerimises osalevaid ensüüme, mille ekspressiooni ColRS süsteem tsingiliias aktiveerib ja seetõttu on rakud PP0035-PP0034-PP0033 operoni deleteerimisel mõnevõrra tsingitundlikumad. PP0035-PP0034-PP0033 operoni transkriptsioon suureneb tsingiliias vähesel määral ka ColRS süsteemist sõltumatult (Joonis 8), mis samuti toetab selle operoni tähtsust tsingilii korral.

Lisaks eeltoodule viitavad ka mitmed teised kirjanduslikud andmed sellele, et ColRS süsteem reguleerib LPS'ide sünteesi (de Weert jt., 2006; Kivistik jt., 2009; Yan ja Wang, 2011). Samas ei erine *P. putida colR*- ja *colS*-defektsete tüvede lipopolüsahhariidide mustrid tsingiliias kasvades samades tingimustes kasvanud algtüve lipopolüsahhariidide mustrist (Joonis 13A), mis näitab, et ColRS süsteem ei ole *P. putida*'s nähtavalt lipopolüsahhariidide sünteesiga seotud. Lipopolüsahhariidide modifikatsioonid muudavad aga LPS'de suurust liiga vähe, et seda oleks LPS'de mustri analüüsimiseks kasutatud meetodiga näha, ja seetõttu ei saa välistada, et ColRS süsteem siiski on lipopolüsahhariidide modifitseerimises oluline.

LPS'de mustrite võrdlemisel selgus, et tsingiliias muutub erineva suurusega LPS'de suhe (Joonis 13B). Tsingiliias kasvanud rakkudel on rohkem lühikesi ja vähem pikki

lipopolüsahhariide, sõltumata ColRS süsteemi olemasolust. See võib tuleneda sellest, et tsingistressi korral on rakkudel raskusi pikaahelaliste lipopolüsahhariidide sünteesiga, kuigi ei saa ka välistada, et LPS'ide suhte muutus on spetsiifiline vastus metalliliiiale.

Kuna ühegi teadaoleva ColR-reguleeritava geeni deleteerimisel või katkestamisel ei muutunud rakud nii tsingitundlikuks kui on ColRS süsteemi suhtes defektsed rakud, siis viitab see, et analüüsitud kuus geeni ja kaks operoni ei ole ilmselt terve ColR regulon. ColR reguloni geenide ennustamiseks kasutatud ColR'i seondumise konsensusjärjestus koostati esialgselt vaid kahe järjestuse põhjal ja kuigi iga uue ColR-sõltuva promootori tuvastamisel ennustust uuendati (Kivistik jt., 2009), võib ennustus sellegipoolest olla kallutatud ja tegelikult suudab ColR seonduda ka senikirjeldatud konsensusjärjestusest mõnevõrra erinevatele järjestustele. Olemasoleva ColR'i seondumisjärjestuse abil ei ole neid geene võimalik üles leida ja uute ColR-reguleeritavate geenide tuvastamiseks oleks vaja kasutada teisetüübilisi katseid. Kuna nüüd on teada, et ColRS süsteem aktiveerub metalliliias, siis saaks uute ColR-sõltuvate geenide tuvastamiseks kasutada proteoomi analüüsi, võrreldes näiteks tsingiliias kasvanud algtüve ja *colR*-defektse tüve proteoome.

2.4.3. ColRS süsteem on tsingiliias vajalik välismembraani valgulise koostise muutmiseks

Välismembraani valgumustrite võrdlus näitas, et *P. putida* algtüve PaW85 ja *colR*-defektse tüve valgumustrid erinevad mitmete valkude osas, kui rakud on kasvanud tsingiliias, kuid mitte siis, kui nad on kasvanud tavalises LB söötmes (Joonis 14). Seega on ColRS süsteem tsingiliias vajalik osade välismembraani valkude ekspressiooni reguleerimiseks. Lisaks ColR-sõltuvatele muutustele toimub tsingiliias kasvanud algtüve rakkude välismembraani valgumustris ka mitmeid ColR-sõltumatuid muutusi, mis on ootuspärane, sest metalliliias vähendavad bakterid metalliioonide importi ja suurendavad nende rakust välja pumpamist. Mõlemal juhul toimub see valguliste komplekside abil (Nies, 2007). Gramnegatiivsetel bakteritel paikneb enamus transportereid sisemembraanis, transportides tsingiioone tsütoplasmast periplasmasse või vastupidi, kuigi on ka läbi välismembraani ioone välja transportivaid komplekse (Blencowe ja Morby, 2003). Välismembraanis paiknevad poriidid, mille abil metalliioonid pääsevad väliskeskkonnast periplasmasse (Nikaido, 2003), ja näiteks *P. putida* Cd001 tüves on näidatud, et kaadmiumiliias muudetakse välismembraani poriidide koguseid vastusena metalliliiiale (Manara jt., 2012). Seega on tõenäoline, et ka osa *P. putida* PaW85 välismembraani valgumustri muutusest, nii ColR-sõltuvates kui ka ColR-sõltumatutes, on põhjustatud poriidide koguste muutumisest.

Ka varem on näidatud, et *P. putida*'s ColRS süsteem seotud välismembraani valgulise homöostaasi kontrollimisega ja *colR*-defektne tüvi ei talu liigsest poriinide ekspressioonist tingitud membraanistressi (Putrinš jt., 2011). Lisaks on teada, et ColRS süsteemi suhtes defektsete rakkude membraan on läbilaskvam kui algtüve oma. Seega võiks arvata, et ColRS süsteemi vahendatud geeniregulatsioon on vajalik välismembraani läbilaskvuse vähendamiseks ja et *colR*- ning *colS*-defektsete tüvede metallitundlikkuse suurenemine on põhjustatud sellest, et metalliioonid pääsevad metalliioonid lihtsamini rakku sisse. Samas ei ole *colR*- ja *colS*-defektsed tüved tundlikumad kõigi metallide suhtes, vaid ainult tsingi-, raua- ja mangaaniliiale. Rauda ja tsinki vajavad rakud siirdemetallidest kõige suuremas koguses (Outten ja O'Halloran, 2001) ja mangaani peetakse laialtlevinud siirdemetallidest kõige vähem toksiliseks (Nies ja Grass, 2009). Seetõttu võib oletada, et vähemvajalike ja toksilisemate metallide väljatransportimiseks on rakkudel rohkem spetsiifilisi sensor- ja transportsüsteeme, mis suudavad tsütoplasmasse sattunud metalliioonidele piisavalt kiiresti reageerida ja need välja viia ning sellepärast ei mõjuta membraani läbilaskvuse suurenemine rakkude tundlikkust nende metallide suhtes.

2.4.4. ColS kui metallisensor

P. putida PaW85 ColS valgu periplasmaatilises osas on neli glutamiinhapet (E), positsioonides 38, 96, 126 ja 129, ja üks asparagiinhape (D), positsioonis 57, mis on täielikult konserveerunud kõikides kolmekümne seitsmes sekveneeritud genoomiga pseudomonaadi ColS valkudes (Joonis 15). Kuna glutamiinhape ja asparagiinhape on ühed sagedasimad metalliioone siduvad aminohapped valkudes (Ma jt., 2009), siis eeldades, et kõikides pseudomonaadides on ColRS süsteem sarnase funktsiooniga, võiksid just need viis aminohapet osaleda metalliioonide seondumises ColS valguga ja seeläbi ka signaali äratundmises. Kui asendada ColS valgu positsioonides 126 ja 129 asuvad glutamiinhapped (FEERE järjestus ColS'is) glutamiiniga, siis väheneb mõnevõrra rakkude rauataluvus (Joonis 16). Mõlema glutamiinhappe asendamisel samaaegselt väheneb rauataluvus veelgi, kuid siiski mitte nii palju kui *colS*-defektsetel rakkudel. Ühegi teise konserveerunud glutamiinhappe või asparagiinhappe asendamine rauataluvust ei mõjuta (Joonis 16). Need tulemused viitavad, et ColS valgu positsioonides 126 ja 129 paiknevad glutamiinhapped osalevad koos raualiia tunnetamises, kuid arvatavasti on mõni aminohape veel lisaks vajalik. Sarnaselt ColRS süsteemile aktiveerib raud *Salmonella* liikides PmrAB signaaliraja, mille sensorvalgus PmrB seob Fe^{3+} ioone samasugune valgujärjestus, ExxE, kus x tähistab suvalist aminohapet (Wösten jt., 2000). Sarnane järjestus RExxE on olemas ka mitmes eukarüooti rauda siduvas valgus

nagu näiteks rauatransporterites FTR1 (Stearman jt., 1996), CaFTR1, CaFTR2 (Ramanan ja Wang, 2000) ja imetajate ferritiinis (Tripathi jt., 1995), mis toetab minu järeldust, et ColS'i 126. ja 129. glutamiinhapet sisaldav motiiv FEERE võiks osaleda rauaioonide sidumises.

Ükski ColS'i periplasmaatilises osas tehtud mutatsioon ei vähendanud bakteri tsingitaluvust (Joonis 16), mis näitab, et need asendusmutatsioonid ei mõjuta ColS'i võimet tunda ära tsingiliiga. See võib tähendada, et antud aminohapped ei osale Zn^{2+} ionide sidumises. Võimalik, et kõikide pseudomonaadide ColRS süsteemid ei tunneta tsingiliiga, mistõttu Zn^{2+} siduv järjestus ei ole ColS valkudes konserveerunud ja *P. putida* PaW85's seovad Zn^{2+} mõned teised periplasmaatilise osa aminohapped, mitte analüüsitud glutamiinhapped ega 57 positsioonis asuv asparagiinhape. Tavaliselt osaleb ühe Zn^{2+} iooni sidumises mitu aminohapet korraga ja enamasti on selleks kombinatsioon histidiinidest, tsüsteiinidest ja glutamiin- ning asparagiinhapetest (Karlin ja Zhu, 1997). *P. putida* ColS'i periplasmaatilises osas on suhteliselt hästi konserveerunud ka mõned histidiinid: näiteks H35, H95 ja H105. Edaspidiste katsetega võiks analüüsida, kas need histidiinid võiksid osaleda Zn^{2+} sidumises. Kuna Zn^{2+} iooni seob korraga mitu aminohapet, siis on ka võimalik, et ühe vajaliku aminohappe puudumine ei ole veel piisav, et mõjutada metalliiooni seondumist valguga. Ei saa ka välistada, et tegelikult võib Zn^{2+} ioone siduda mõni teine periplasmas asuv valk, mis seejärel on signaaliks, mida ColS ära tunneb. Näiteks on *S. enterica*'s näidatud, et ZraSR signaaliraja aktiivsust reguleerib periplasmaatiline Zn^{2+} iooniga seonduv valk ZraP (Appia-Ayme jt., 2012).

2.4.5. Tsingi- ja mangaaniliig indutseerib *P. putida*'s siderofooride sünteesi

P. putida erinevate tüvede kasvu võrdlemisel metallisooli sisaldavatel söötmetel ilmnes, et $ZnSO_4$ ja $MnCl_2$ juuresolekul hakkavad rakud tootma siderofoore. Seda on näha rakkude ja neid ümbritseva söötme värvumisest kollaseks (Joonis 5). Ka mitmed teised bakteriliigid hakkavad metalliliias siderofoore tootma. Näiteks *P. aeruginosa*'s indutseerib siderofooride sünteesi nii 10 μM Al^{3+} , Cu^{2+} , Ga^{3+} , Mn^{2+} (Braud jt., 2009a) kui ka 100 μM Co^{2+} ja Zn^{2+} kogus söötmes (Visca jt., 1992). Siderofoorid on madala molekulmassiga ühendid, mida sünteesitakse eelkõige väliskeskkonnast vahelahustuva Fe^{3+} kättesaamiseks (Chu jt., 2010), kuid mis lisaks Fe^{3+} ionidele suudavad siduda ka teiste metallide ioone, kuigi väiksema afiinsusega (Braud jt., 2009b). Samas transpordivad rauatransporterid rakku enamasti ainult Fe^{3+} iooniga seondunud siderofoore (Braud jt., 2009b). *P. aeruginosa*'s on näidatud, et siderofoore tootvad tüved taluvad metallide liiga paremini, kui siderofoore mittetootvad tüved (Braud jt., 2010). Kuna teised metalliioonid peavad gramnegatiivsetesse rakkudesse

pääsemiseks esmalt difundeeruma läbi poriinide periplasmasse, siis arvatakse, et siderofoorid, seondudes liias olevate metalliioonidega, takistavad metalliioonide liikumist läbi poriinide rakku (Braud jt., 2010).

Tsink kui tiol- ja hüdroksüülrühmade suhtes affiinsem metall suudab rauaioonid valkudest välja konkureerida (Irving ja Williams, 1953). Võimalik, et tsingiliias on siderofooride sünteesi põhjuseks ka see, et Zn^{2+} asendab valkudes rauaioonid ja rakus tekib näiliselt rauapuudus, mistõttu nad üritavad keskkonnast rohkem rauda kätte saada. Siderofooride sünteesi reguleerib Fur valk, mis tunnetab rakus oleva raua hulka. Juhul, kui rakus on piisavalt rauda, on Fur valguga seondunud Fe^{2+} ioonid ja Fur repressseerib siderofooride sünteesiks vajalike geenide ekspressiooni (Katigbak ja Zhang, 2012). Fur valgul on ka tsingi seondumisjärjestus, kuid tsink on vajalik vaid valgu struktuuri säilitamiseks (de Peredo jt., 1999). Zn^{2+} sidumine ei muuda Fur valku aktiivseks repressoriks (Bagg ja Neilands, 1987). Arvatavasti indutseeritakse siderofooride süntees tsingiliias sellepärast, et Zn^{2+} ioonid konkureerivad Fe^{2+} ioonidega Fur valguga seondumise pärast ning kuna Zn^{2+} iooniga seondunud Fur ei ole aktiivne repressor, siis ei repressseerita siderofooride geenide ekspressiooni, kuigi tõenäoliselt raua kontsentatsiooni järgi rakkudes ei oleks rakud rauanäljas.

Kõik siirdemetallid on bakteritele suures koguses toksilised, kuid samas on mitmed neist rakkudele vajalikud. Seetõttu on bakteritele oluline, et rakusisesed metalliioonide kontsentratsioonid hoitaks kindlates vahemikes, millele viitab ka eelpool kirjeldatud siderofooride vastus Zn^{2+} ja Mn^{2+} liia korral. Kuigi ColRS süsteemi aktiveerivad tingimused on nüüd teada, peavad järgnevad uuringud veel selgitama, milline on täielik ColR-regulon ja mis on ColRS süsteemi täpsem roll metalliliias.

Kokkuvõte

Kahekomponentsed süsteemid on bakteritele vajalikud mitmesuguste keskkonnatingimuste tunnetamiseks. Kuna ColRS süsteemi kohta oli varasemalt teada, et mitmetes bakteriliikides, sealhulgas ühes *P. putida* tüves, on see süsteem vajalik metalliilia talumiseks (Hu ja Zhao, 2007), siis sai minu töö eesmärgiks teha kindlaks, kas ka *P. putida* PaW85 tüves on ColRS süsteem seotud metalliilia tunnetamise ja talumisega.

Tulemused näitasid, et:

- 1) *P. putida* PaW85 ColRS signaalirada aktiveerub vastusena tsingi-, raua-, mangaani- ja kaadmiumiiliale;
- 2) ColRS süsteem suurendab *P. putida* tsingi-, raua- ja mangaaniresistentsust;
- 3) teadaolevatest ColR-reguleeritavatest geenidest on tsingitaluvusega nähtavalt seotud ainult PP0035-PP0034-PP0033 operon ja sedagi vähesel määral, mis viitab, et ColR regulon on ebatäielik;
- 4) ColRS süsteem ei ole metalliilias vajalik lipopolüsahhariidide mustri muutmiseks;
- 5) ColRS süsteem reguleerib tsingiliias teatud välismembraani valkude ekspressiooni;
- 6) tõenäoliselt osalevad ColS valgu periplasmaatilise osa positsioonides 126 ja 129 paiknevad glutamiinhapped rauaiooni sidumises ja seeläbi ka signaali otseses äratundmises;
- 7) ükski pseudomonaadide ColS valkude periplasmaatilises osas konserveerunud glutamiin- ega asparagiinhapetest ei ole nähtavalt seotud tsingiiooni sidumisega.

Nendest tulemustest võib järeldada, et ColRS süsteem on metalliliiga tunnetav ja sellele vastav signaalirada, mis tagab *P. putida* rakkudele resistentsuse tsingi, raua ja mangaani suhtes. Kuna aga kogu ColR regulon ei ole ilmselt teada ja teadaolevate ColR-reguleeritavate geenide abil ei ole võimalik seletada, miks on *colR*- ja *colS*-defektsed rakud tsingi, raua ja mangaani suhtes tundlikumad, siis peavad edasised uuringud selgitama, kuidas täpselt on ColRS süsteem rakkudele metalliilias vajalik.

***Pseudomonas putida*'s ColRS system is zinc, iron, manganese and cadmium sensing two-component signal transduction system**

Kadi Ainsaar

Summary

Several transition metals play important roles in living organisms. Although different organisms require varying set of transition metals, iron, zinc, manganese, copper, cobalt, nickel and molybdenum are needed by all organisms. Transition metals act as cofactors for many enzymes but some, such as zinc, are also important in the maintenance of protein structure. On the other hand, whereas some transition metals are needed, all metals are toxic when present in excess (Frausto da Silva ja Williams, 2001; Nies ja Grass, 2009). Therefore it is crucial for cells to maintain the concentration of metal ions inside the cell between certain levels.

Bacteria protect themselves against metal excess and limitation by regulating the amount of metal ions imported into the cell and exported out of the cell. As metal ions do not diffuse across membranes their transport is facilitated by protein complexes (Nies, 2007). In addition to regulating metal ion transport bacteria regulate the amount of proteins requiring or binding metal ions. If metal ions are limited the synthesis of proteins using this metal is decreased and if possible these proteins are replaced with other proteins having similar function. If there are too many metal ions the synthesis of metal storage proteins is increased (Masse ja Gottesman, 2002). Some bacteria also modify their lipopolysaccharide to reduce the amount of metal ions bound with membrane (Nishino jt., 2006).

Bacteria have developed two-component signal transduction systems to sense different environmental conditions, including metal excess or limitation. One two-component signal transduction systems conserved in *Pseudomonas* species is ColRS (Winsor jt., 2009). ColRS is a typical signal transduction system where ColS is sensor kinase located in cytoplasmic membrane (Dekkers jt., 1998) that recognizes signal and phosphorylates cytoplasmic transcription regulator ColR (Hõrak jt., 2004). Phosphorylated ColR can then activate or repress transcription of its regulated genes (Kivistit jt., 2009). As it was known that several bacteria species, including one *P. putida* strain, need ColRS system to tolerate transition metals (Hu ja Zhao, 2007; Zhang jt., 2008; Yan ja Wang, 2011), the aim of this work was to find out whether ColRS system is also important for *P. putida* PaW85 strain in metal excess conditions and whether metals could act as a signal for ColS.

Results indicate that:

- 1) the ColRS signal transduction system of *P. putida* strain PaW85 activates in response to zinc, iron, manganese and cadmium ions;
- 2) ColRS system increases *P. putida*'s zinc, iron and manganese resistance;
- 3) of known ColR regulated genes only PP0035-PP0034-PP0033 operon is evidently involved in zinc tolerance, although slightly;
- 4) ColRS system is not needed to change lipopolysaccharide pattern in metal excess conditions;
- 5) ColRS system regulates the expression of certain outer membrane proteins in zinc excess;
- 6) it is likely that the glutamic acids of ColS in positions 126 and 129 participate in iron ion binding and thereby are involved in direct signal recognition;
- 7) none of the glutamic or aspartic acid conserved in the periplasmic domain of ColS is visibly involved in zinc ion binding.

From these results it can be concluded that ColRS is a signal transduction system that senses metal excess and provides zinc, iron and manganese resistance in *P. putida* cells. Data also suggest that the entire ColR regulon is not yet described and with known ColR regulated genes it is not possible to explain why *colR* and *colS* deficient strains are more sensitive to zinc, iron and manganese. Thus, further work needs to be done in order to explain why exactly ColRS system is essential in metal excess conditions.

Kasutatud kirjandus

- Andrews, S. C., (1998) Iron storage in bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, Vol 40 40: 281-351.
- Appia-Ayme, C., Hall, A., Patrick, E., Rajadurai, S., Clarke, T. A. *et al.*, (2012) ZraP is a periplasmic molecular chaperone and a repressor of the zinc-responsive two-component regulator ZraSR. *Biochemical Journal* 442: 85-93.
- Atkins, P. W., and Jones, L. L., 2008. The Elements: The d-block, p. 667-704. In P. W. Atkins, L. L. Jones, J. Fiorillo (ed), Chemical principles The quest for insight, 8th ed., W. H. Freeman and Company, New York.
- Bagg, A., and Neilands, J. B., (1987) Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron(II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 26: 5471-5477.
- Bao, Y., Lies, D. P., Fu, H. and Roberts, G. P., (1991) An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes of gram-negative bacteria *Gene* 109: 167-168.
- Bayley, S. A., Duggleby, C. J., Worsey, M. J., Williams, P. A., Hardy, K. G. *et al.*, (1977) Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Molecular & general genetics* : MGG 154: 203-204.
- Blencowe, D. K., and Morby, A. P., (2003) Zn(II) metabolism in prokaryotes. *Fems Microbiology Reviews* 27: 291-311.
- Blindauer, C. A., Harrison, M. D., Robinson, A. K., Parkinson, J. A., Bowness, P. W. *et al.*, (2002) Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. *Molecular Microbiology* 45: 1421-1432.
- Botella, H., Peyron, P., Levillain, F., Poincloux, R., Poquet, Y. *et al.*, (2011) Mycobacterial P-1-Type ATPases Mediate Resistance to Zinc Poisoning in Human Macrophages. *Cell Host & Microbe* 10: 248-259.
- Botella, H., Stadthagen, G., Lugo-Villarino, G., de Chastellier, C. and Neyrolles, O., (2012) Metallobiology of host-pathogen interactions: an intoxicating new insight. *Trends in Microbiology* 20: 106-112.
- Braud, A., Geoffroy, V., Hoegy, F., Mislin, G. L. A. and Schalk, I. J., (2010) Presence of the siderophores pyoverdine and pyochelin in the extracellular medium reduces toxic metal accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and increases bacterial metal tolerance. *Environmental Microbiology Reports* 2: 419-425.
- Braud, A., Hannauer, M., Mislin, G. L. A. and Schalk, I. J., (2009a) The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. *Journal of Bacteriology* 191: 3517-3525.
- Braud, A., Hoegy, F., Jezequel, K., Lebeau, T. and Schalk, I. J., (2009b) New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environmental Microbiology* 11: 1079-1091.
- Braun, V., and Hantke, K., (2011) Recent insights into iron import by bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology* 15: 328-334.
- Breazeale, S. D., Ribeiro, A. A., McClerren, A. L. and Raetz, R. H., (2005) A formyltransferase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli* and the modification of lipid A with 4-amino-4-deoxy-L-arabinose Identification and function of UDP-4-deoxy-4-formamido-L-arabinose. *Journal of Biological Chemistry* 280: 14154-14167.
- Chevallet, M., Luche, S. and Rabilloud, T., (2006) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols* 1: 1852-1858.
- Chu, B. C., Garcia-Herrero, A., Johanson, T. H., Krewulak, K. D., Lau, C. K. *et al.*, (2010) Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *Biometals* 23: 601-611.
- Cui, J., Kaandorp, J. A. and Lloyd, C. M., (2008) Simulating in vitro transcriptional response of zinc homeostasis system in *Escherichia coli*. *Bmc Systems Biology* 2.

- Dao, K. H. T., Hamer, K. E., Clark, C. L. and Harshman, L. G., (1999) Pyoverdine production by *Pseudomonas aeruginosa* exposed to metals or an oxidative stress agent. *Ecological Applications* 9: 441-448.
- de Peredo, A. G., Saint-Pierre, C., Adrait, A., Jacquamet, L., Latour, J. M. *et al.*, (1999) Identification of the two zinc-bound cysteines in the ferric uptake regulation protein from *Escherichia coli*: Chemical modification and mass spectrometry analysis. *Biochemistry* 38: 8582-8589.
- de Weert, S., Dekkers, L. C., Bitter, W., Tuinman, S., Wijffjes, A. H. M. *et al.*, (2006) The two-component colR/S system of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 plays a role in rhizosphere competence through maintaining the structure and function of the outer membrane. *Fems Microbiology Ecology* 58: 205-213.
- Dekkers, L. C., Bloemendaal, C. J. P., de Weger, L. A., Wijffelman, C. A., Spaink, H. P. *et al.*, (1998) A two-component system plays an important role in the root-colonizing ability of *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 45-56.
- Dubrac, S., and Touati, D., (2000) Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: Functional analysis of the *sodB* promoter. *Journal of Bacteriology* 182: 3802-3808.
- Flo, T. H., Smith, K. D., Sato, S., Rodriguez, D. J., Holmes, M. A. *et al.*, (2004) Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432: 917-921.
- Forbes, J. R., and Gros, P., (2003) Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane. *Blood* 102: 1884-1892.
- Frausto da Silva, J. J. R., and Williams, R. J. P., 2001. The chemical elements in biology, p. 7-28. In J. J. R. Frausto da Silva and R. J. P. Williams (eds), The biological chemistry of the elements The inorganic chemistry of life, 2nd ed., Oxford University Press, New York.
- Garvis, S., Munder, A., Ball, G., de Bentzmann, S., Wiehlmann, L. *et al.*, (2009) *Caenorhabditis elegans* Semi-Automated Liquid Screen Reveals a Specialized Role for the Chemotaxis Gene *cheB2* in *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Plos Pathogens* 5.
- Gonzalez-Guerrero, M., Raimunda, D., Cheng, X. and Argueello, J. M., (2010) Distinct functional roles of homologous Cu plus efflux ATPases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 78: 1246-1258.
- Grass, G., Franke, S., Taudte, N., Nies, D. H., Kucharski, L. M. *et al.*, (2005) The metal permease ZupT from *Escherichia coli* is a transporter with a broad substrate spectrum. *Journal of Bacteriology* 187: 1604-1611.
- Gunn, J. S., Lim, K. B., Krueger, J., Kim, K., Guo, L. *et al.*, (1998) PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Molecular Microbiology* 27: 1171-1182.
- Gutu, A. D., Sgambati, N., Strasbourger, P., Brannon, M. K., Jacobs, M. A. *et al.*, (2013) Polymyxin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* *phoQ* Mutants Is Dependent on Additional Two-Component Regulatory Systems. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57: 2204-2215.
- Hancock, R. E. W., and Brinkman, F. S. L., (2002) Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annual Review of Microbiology* 56: 17-38.
- Hausinger, R. P. Zamble, D. B. 2007. Microbial Physiology of Nickel and Cobalt, p. 287- 320. In D. H. Nies and S. Silver (eds.), Molecular Microbiology of Heavy Metals, Springer-Verlag, Berlin
- Herrero, M., Delorenzo, V. and Timmis, K. N., (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 172: 6557-6567.
- Hood, M. I., and Skaar, E. P., (2012) Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nature Reviews Microbiology* 10: 525-537.
- Horsburgh, M. J., Wharton, S. J., Karavolos, M. and Foster, S. J., (2002) Manganese: elemental defence for a life with oxygen? *Trends in Microbiology* 10: 496-501.
- Hu, N., and Zhao, B., (2007) Key genes involved in heavy-metal resistance in *Pseudomonas putida* CD2. *Fems Microbiology Letters* 267: 17-22.
- Hörak, R., Ilves, H., Pruunsild, P., Kuljus, M. and Kivisaar, M., (2004) The ColR-ColS two-component signal transduction system is involved in regulation of Tn4652 transposition in *Pseudomonas putida* under starvation conditions. *Molecular Microbiology* 54: 795-807.

- Hänzelmann, P., and Meyer, O., (1998) Effect of molybdate and tungstate on the biosynthesis of CO dehydrogenase and the molybdopterin cytosine-dinucleotide-type of molybdenum cofactor in *Hydrogenophaga pseudoflava*. *European Journal of Biochemistry* 255: 755-765.
- Irving, H. M. N. H., and Williams, R. J. P., (1953) The stability of transition-metal complexes. *Journal of the Chemical Society*: 3192–3210.
- Jabado, N., Jankowski, A., Dougaparsad, S., Picard, V., Grinstein, S. *et al.*, (2000) Natural resistance to intracellular infections: Natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *Journal of Experimental Medicine* 192: 1237-1247.
- Jensen, W. B., (2003) The place of zinc, cadmium, and mercury in the periodic table. *Journal of Chemical Education* 80: 952-961.
- Ji, C., Juarez-Hernandez, R. E. and Miller, M. J., (2012) Exploiting bacterial iron acquisition: siderophore conjugates. *Future Medicinal Chemistry* 4: 297-313.
- Karlin, S., and Zhu, Z. Y., (1997) Classification of mononuclear zinc metal sites in protein structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 14231-14236.
- Katigbak, J., and Zhang, Y., (2012) Iron binding site in a global regulator in bacteria-ferric uptake regulator (Fur) protein: structure, Mössbauer properties, and functional implication. *Journal of Physical Chemistry Letters* 3: 3503-3508.
- Kato, A., Chen, H. D., Latifi, T. and Groisman, E. A., (2012) Reciprocal Control between a Bacterium's Regulatory System and the Modification Status of Its Lipopolysaccharide. *Molecular Cell* 47: 897-908.
- Kiley, P. J., and Beinert, H., (2003) The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 6: 181-185.
- Kittelberger, R., and Hilbink, F., (1993) Sensitive Silver-Staining Detection of Bacterial Lipopolysaccharides in Polyacrylamide Gels. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 26: 81-86.
- Kivistik, P. A., Kivi, R., Kivisaar, M. and Hörak, R., (2009) Identification of CoIR binding consensus and prediction of regulon of CoIRS two-component system. *Bmc Molecular Biology* 10: 797-805.
- Kivistik, P. A., Putrins, M., Puvi, K., Ilves, H., Kivisaar, M. *et al.*, (2006) The CoIRS two-component system regulates membrane functions and protects *Pseudomonas putida* against phenol. *Journal of Bacteriology* 188: 8109-8117.
- Kletzin, A., and Adams, M. W. W., (1996) Tungsten in biological systems. *Fems Microbiology Reviews* 18: 5-63.
- Koch, B., Jensen, L. E. and Nybroe, O., (2001) A panel of Tn7-based vectors for insertion of the gfp marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. *Journal of Microbiological Methods* 45: 187-195.
- Köster, W., (2001) ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B-12. *Research in Microbiology* 152: 291-301.
- Lee, L. J., Barrett, J. A. and Poole, R. K., (2005) Genome-wide transcriptional response of chemostat-cultured *Escherichia coli* to zinc. *Journal of Bacteriology* 187: 1124-1134.
- Lee, S. W., Glickmann, E. and Cooksey, D. A., (2001) Chromosomal locus for cadmium resistance in *Pseudomonas putida* consisting of a cadmium-transporting ATPase and a MerR family response regulator. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1437-1444.
- Ma, Z., Jacobsen, F. E. and Giedroc, D. P., (2009) Coordination Chemistry of Bacterial Metal Transport and Sensing. *Chemical Reviews* 109: 4644-4681.
- Makui, H., Roig, E., Cole, S. T., Helmann, J. D., Gros, P. *et al.*, (2000) Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Molecular Microbiology* 35: 1065-1078.
- Manara, A., DalCorso, G., Baliardini, C., Farinati, S., Cecconi, D. *et al.*, (2012) *Pseudomonas putida* Response to Cadmium: Changes in Membrane and Cytosolic Proteomes. *Journal of Proteome Research* 11: 4169-4179.
- Martinez-Garcia, E., and de Lorenzo, V., (2011) Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* 13: 2702-2716.

- Masse, E., and Gottesman, S., (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 4620-4625.
- McNicholas, P. M., and Gunsalus, R. P., (2002) The molybdate-responsive *Escherichia coli* ModE transcriptional regulator coordinates periplasmic nitrate reductase (*napFDAGHBC*) operon expression with nitrate and molybdate availability. *Journal of Bacteriology* 184: 3253-3259.
- Miller, J. H. (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbour, NY., ColdSpring Harbour Laboratory Press.
- Miller, C. D., Pettee, B., Zhang, C., Pabst, M., McLean, J. E. *et al.*, (2009) Copper and cadmium: responses in *Pseudomonas putida* KT2440. *Letters in Applied Microbiology* 49: 775-783.
- Morby, A. P., Turner, J. S., Huckle, J. W. and Robinson, N. J., (1993) SmtB is a metal-dependent repressor of the cyanobacterial metallothionein gene *smtA*: identification of a Zn inhibited DNA-protein complex. *Nucleic Acids Research* 21: 921-925.
- Nanamiya, H., Akanuma, G., Natori, Y., Murayama, R., Kosono, S. *et al.*, (2004) Zinc is a key factor in controlling alternation of two types of L31 protein in the *Bacillus subtilis* ribosome. *Molecular Microbiology* 52: 273-283.
- Nies, D. H. 2007. Bacterial Transition Metal Homeostasis, p. 117- 142. In D. H. Nies and S. Silver (eds.), *Molecular Microbiology of Heavy Metals*, Springer-Verlag, Berlin
- Nies, D. H. Grass, G. 2009. Transition metal homeostasis. In A. Böck, R. Curtiss III, J. B. Kaper, P. D. Karp, F. C. Neidhardt, T. Nyström, J. M. Schlauch, C. L. Squires, and D. Ussery (ed.), *EcoSal—Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. <http://www.ecosal.org>. ASM Press, Washington, DC.
- Nikaido, H., (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 593-+.
- Nishino, K., Hsu, F.-F., Turk, J., Cromie, M. J., Wosten, M. M. S. M. *et al.*, (2006) Identification of the lipopolysaccharide modifications controlled by the *Salmonella* PmrA/PmrB system mediating resistance to Fe(III) and Al(III). *Molecular Microbiology* 61: 645-654.
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T. J. and Buchanan, S. K., 2010 TonB-Dependent Transporters: Regulation, Structure, and Function, pp. 43-60 in *Annual Review of Microbiology, Vol 64, 2010*, edited by S. Gottesman and Harwood, C. S.
- Outten, C. E., and O'Halloran, T. V., (2001) Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* 292: 2488-2492.
- Outten, C. E., Tobin, D. A., Penner-Hahn, J. E. and O'Halloran, T. V., (2001) Characterization of the metal receptor sites in *Escherichia coli* Zur, an ultrasensitive Zinc(II) metalloregulatory protein. *Biochemistry* 40: 10417-10423.
- Patzer, S. I., and Hantke, K., (1998) The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 28: 1199-1210.
- Perron, K., Caille, O., Rossier, C., van Delden, C., Dumas, J. L. *et al.*, (2004) CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry* 279: 8761-8768.
- Putrinš, M., Ainelo, A., Ilves, H. and Hõrak, R., (2011) The ColRS system is essential for the hunger response of glucose-growing *Pseudomonas putida*. *Bmc Microbiology* 11.
- Py, B., and Barras, F., (2010) Building Fe-S proteins: bacterial strategies. *Nature Reviews Microbiology* 8: 436-446.
- Ramanan, N., and Wang, Y., (2000) A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. *Science* 288: 1062-1064.
- Ramos-Gonzalez, M. I., Campos, M. J. and Ramos, J. L., (2005) Analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 gene expression in the maize rhizosphere: In vivo expression technology capture and identification of root-activated promoters. *Journal of Bacteriology* 187: 5504-5504.
- Rapisarda, V. A., Chehin, R. N., Rivas, J. D., Rodriguez-Montelongo, L., Farias, R. N. *et al.*, (2002) Evidence for Cu(I)-thiolate ligation and prediction of a putative copper-binding site in the *Escherichia coli* NADH dehydrogenase-2. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 405: 87-94.
- Rawling, E. G., Brinkman, F. S. L. and Hancock, R. E. W., (1998) Roles of the carboxy-terminal half of *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane protein OprF in cell shape, growth in low-osmolarity medium, and peptidoglycan association. *Journal of Bacteriology* 180: 3556-3562.

- Roy, R., and Adams, M. W. W., (2002) Characterization of a fourth tungsten-containing enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Bacteriology* 184: 6952-6956.
- Schägger, H., (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols* 1: 16-22.
- Solioz, M., Abicht, H. K., Mermod, M. and Mancini, S., (2010) Response of Gram-positive bacteria to copper stress. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 15: 3-14.
- Stearman, R., Yuan, D. S., YamaguchiIwai, Y., Klausner, R. D. and Dancis, A., (1996) A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* 271: 1552-1557.
- Stock, A. M., Robinson, V. L. and Goudreau, P. N., (2000) Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry* 69: 183-215.
- Subramoni, S., Pandey, A., Priya, M. R. V., Patel, H. K. and Sonti, R. V., (2012) The ColRS system of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is required for virulence and growth in iron-limiting conditions. *Molecular Plant Pathology* 13: 690-703.
- Zhang, S. S., He, Y. Q., Xu, L. M., Chen, B. W., Jiang, B. L. *et al.*, (2008) A putative colR(XC1049)-col(XC1050) two-component signal transduction system in *Xanthomonas campestris* positively regulates *hrpC* and *hrpE* operons and is involved in virulence, the hypersensitive response and tolerance to various stresses. *Research in Microbiology* 159: 569-578.
- Zhu, M. G., Valdebenito, M., Winkelmann, G. and Hantke, K., (2005) Functions of the siderophore esterases IroD and IroE in iron-salmochelin utilization. *Microbiology-Sgm* 151: 2363-2372.
- Touati, D., (2000) Iron and oxidative stress in bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373: 1-6.
- Trent, M. S., Ribeiro, A. A., Lin, S. H., Cotter, R. J. and Raetz, C. R. H., (2001) An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A Induction in polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. *Journal of Biological Chemistry* 276: 43122-43131.
- Trikha, J., Theil, E. C. and Allewell, N. M., (1995) High-resolution crystal structures of amphibian red-cell L-ferritin: potential roles for structural plasticity and solvation in function. *Journal of Molecular Biology* 248: 949-967.
- Tseng, H. J., Srikhanta, Y., McEwan, A. G. and Jennings, M. P., (2001) Accumulation of manganese in *Neisseria gonorrhoeae* correlates with resistance to oxidative killing by superoxide anion and is independent of superoxide dismutase activity. *Molecular Microbiology* 40: 1175-1186.
- Winsor, G. L., Van Rossum, T., Lo, R., Khaira, B., Whiteside, M. D. *et al.*, (2009) Pseudomonas Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Research* 37: D483-D488.
- Visca, P., Colotti, G., Serino, L., Verzili, D., Orsi, N. *et al.*, (1992) Metal regulation of siderophores synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore-metal complexes *Applied and Environmental Microbiology* 58: 2886-2893.
- Wong, S. M., and Mekalanos, J. J., (2000) Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 10191-10196.
- Wösten, M. M. S. M., Kox, L. F. F., Chamnongpol, S., Soncini, F. C. and Groisman, E. A., (2000) A signal transduction system that responds to extracellular iron. *Cell* 103: 113-125.
- Yan, Q., and Wang, N. A., (2011) The ColR/ColS Two-Component System Plays Multiple Roles in the Pathogenicity of the Citrus Canker Pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Journal of Bacteriology* 193: 1590-1599.

Kasutatud veebiaadressid:

Israel Science and Technology Homepage List of Periodic Table Elements Sorted by Abundance in Earth's crust, www.science.co.il, (05.04.2013)

Pseudomonas Genome Database, www.pseudomonas.com, (12.05.2013)

Lisa 1

Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Bakteritüvi	Iseloomustus	Allikas
<i>Escherichia coli</i>		
CC118λpir	Δ(ara-leu) araD ΔlacX74 galK phoA20 thi-1 rspE rpo B argE (Am)	(Herrero jt., 1990)
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW85	Algne tüvi, isogeenne täielikult sekveneeritud <i>P. putida</i> KT2440 tüvega	(Bayley jt., 1977)
<i>colR</i>	PaW85 <i>colR</i> ::Km (Km ^r)	(Hõrak jt., 2004)
<i>colS</i>	PaW85 <i>colS</i> ::Km (Km ^r)	(Hõrak jt., 2004)
<i>colRtaccolR</i> ehk R _{tacR}	<i>colR</i> , mille kromosoomi on viidud P _{tac} promootori ja <i>lacI^q</i> repressori kontrolli all olev <i>colR</i> (Km ^r Tel ^r)	(Hõrak jt., 2004)
<i>colRtaccolRD51A</i> ehk R _{tacR} _{D51A}	<i>colR</i> , mille kromosoomi on viidud P _{tac} promootori ja <i>lacI^q</i> repressori kontrolli all olev <i>colRD51A</i> (Km ^r Tel ^r)	(Hõrak jt., 2004)
StacS	<i>colS</i> , mille kromosoomi on viidud P _{tac} promootori ja <i>lacI^q</i> repressori kontrolli all olev <i>colS</i> (Km ^r Sm ^r)	käesolev töö
StacS _{E38Q}	<i>colS</i> , mille kromosoomi on viidud P _{tac} promootori ja <i>lacI^q</i> repressori kontrolli all olev <i>colSE38Q</i> (Km ^r Sm ^r)	käesolev töö
StacS _{D57N}	<i>colS</i> , mille kromosoomi on viidud P _{tac} promootori ja <i>lacI^q</i> repressori kontrolli all olev <i>colSD57N</i> (Km ^r Sm ^r)	käesolev töö
StacS _{E96Q}	<i>colS</i> , mille kromosoomi on viidud P _{tac} promootori ja <i>lacI^q</i> repressori kontrolli all olev <i>colSE96Q</i> (Km ^r Sm ^r)	käesolev töö
StacS _{E126Q}	<i>colS</i> , mille kromosoomi on viidud P _{tac} promootori ja <i>lacI^q</i> repressori kontrolli all olev <i>colSE126Q</i> (Km ^r Sm ^r)	käesolev töö
StacS _{E129Q}	<i>colS</i> , mille kromosoomi on viidud P _{tac} promootori ja <i>lacI^q</i> repressori kontrolli all olev <i>colSE129Q</i> (Km ^r Sm ^r)	käesolev töö
StacS _{E126QE129Q}	<i>colS</i> , mille kromosoomi on viidud P _{tac} promootori ja <i>lacI^q</i> repressori kontrolli all olev <i>colSE12QE129Q</i> (Km ^r Sm ^r)	käesolev töö
35-34	PaW85 PP0035-PP0034::Sm (Sm ^r)	Rita Hõrak
900	PaW85 PP0900::Sm (Sm ^r)	Rita Hõrak
903-904	PaW85 PP0903-PP0904::Sm (Sm ^r)	Rita Hõrak
905	PaW85 PP0905::Sm (Sm ^r)	Rita Hõrak
1636	PaW85 PP1636::Sm (Sm ^r)	Külliki Holtsmann
5152	PaW85 PP5152::Sm (Sm ^r)	Rita Hõrak

2579	PaW85 ΔPP2579	käesolev töö
35-33	PaW85 ΔPP0035-PP0033	käesolev töö
903-905	PaW85 ΔPP0903-PP0905	käesolev töö
35-33, 900	PaW85 ΔPP0035-PP0033 ΔPP0900	käesolev töö
35-33, 903-905	PaW85 ΔPP0035-PP0033 ΔPP0903-PP0905	käesolev töö
35-33, 2579	PaW85 ΔPP0035-PP0033 ΔPP2579	käesolev töö
35-33, 903-905, 2579	PaW85 ΔPP0035-PP0033 ΔPP0903-PP0905 Δ2579	käesolev töö
35-33, 903-905, 2579, 900	PaW85 ΔPP0035-PP0033 ΔPP0903-PP0905 Δ2579 PP0900::Sm (Sm ^r)	käesolev töö
35-33, 903-905, 2579, 5152	PaW85 ΔPP0035-PP0033 ΔPP0903-PP0905 Δ2579 PP5152::Sm (Sm ^r)	käesolev töö
268 <i>colR</i>	PaW85 PP0268::Sm <i>colR</i> ::Km (Km ^r Sm ^r)	Rita Hõrak
737 <i>colR</i>	PaW85 ΔPP0737 <i>colR</i> ::Km (Km ^r)	käesolev töö
Plasmiid		
p9TT _B lacZ	Laia peremeesringiga promootori testvektor, mis sisaldab promootorita <i>lacZ</i> geeni (Amp ^r Cm ^r)	(Kivistik jt., 2006)
p9TT _B lacZ/35	p9TT _B lacZ, mille <i>lacZ</i> geeni ette on kloneeritud PP0035 geeni promootorregioon (Amp ^r Cm ^r)	(Kivistik jt., 2009)
p9TT _B lacZ/36	p9TT _B lacZ, mille <i>lacZ</i> geeni ette on kloneeritud PP0036 geeni promootorregioon (Amp ^r Cm ^r)	(Kivistik jt., 2009)
p9TT _B lacZ/268	p9TT _B lacZ, mille <i>lacZ</i> geeni ette on kloneeritud PP0268 geeni promootorregioon (Amp ^r Cm ^r)	(Kivistik jt., 2006)
p9TT _B lacZ/900	p9TT _B lacZ, mille <i>lacZ</i> geeni ette on kloneeritud PP0900 geeni promootorregioon (Amp ^r Cm ^r)	(Kivistik jt., 2009)
p9TT _B lacZ/ <i>colR</i>	p9TT _B lacZ, mille <i>lacZ</i> geeni ette on kloneeritud PP0901 geeni promootorregioon (Amp ^r Cm ^r)	Rita Hõrak
p9TT _B lacZ/903	p9TT _B lacZ, mille <i>lacZ</i> geeni ette on kloneeritud PP0903 geeni promootorregioon (Amp ^r Cm ^r)	Rita Hõrak
p9TT _B lacZ/737	p9TT _B lacZ, mille <i>lacZ</i> geeni ette on kloneeritud PP0737 geeni promootorregioon (Amp ^r Cm ^r)	(Kivistik jt., 2009)
p9TT _B lacZ/1288	p9TT _B lacZ, mille <i>lacZ</i> geeni ette on kloneeritud PP1288 geeni promootorregioon (Amp ^r Cm ^r)	(Kivistik jt., 2006)
p9TT _B lacZ/1636	p9TT _B lacZ, mille <i>lacZ</i> geeni ette on kloneeritud PP1636 geeni promootorregioon (Amp ^r Cm ^r)	(Kivistik jt., 2009)
p9TT _B lacZ/1915	p9TT _B lacZ, mille <i>lacZ</i> geeni ette on kloneeritud PP1915 geeni promootorregioon (Amp ^r Cm ^r)	Rita Hõrak
p9TT _B lacZ/2560	p9TT _B lacZ, mille <i>lacZ</i> geeni ette on kloneeritud PP2560 geeni promootorregioon (Amp ^r Cm ^r)	(Kivistik jt., 2009)
p9TT _B lacZ/2561	p9TT _B lacZ, mille <i>lacZ</i> geeni ette on kloneeritud PP2561 geeni promootorregioon (Amp ^r Cm ^r)	Rita Hõrak
p9TT _B lacZ/2579	p9TT _B lacZ, mille <i>lacZ</i> geeni ette on kloneeritud PP2579 geeni promootorregioon (Amp ^r Cm ^r)	Rita Hõrak
p9TT _B lacZ/3766	p9TT _B lacZ, mille <i>lacZ</i> geeni ette on kloneeritud PP3766 geeni promootorregioon (Amp ^r Cm ^r)	(Kivistik jt., 2009)
p9TT _B lacZ/5152	p9TT _B lacZ, mille <i>lacZ</i> geeni ette on kloneeritud PP5152 geeni promootorregioon (Amp ^r Cm ^r)	Rita Hõrak
pUCNot/ <i>lacI</i> taccolS	pUCNot, mis sisaldab <i>lacI</i> tac-colS ekspressioonikasseti (Amp ^r)	Heili Ilves
pUCNot/ <i>lacI</i> taccolS-	pUCNot, mis sisaldab <i>lacI</i> tac-colS-E38Q	käesolev töö

E38Q	ekspressioonikasseti (Amp ^r)	
pUCNot/lacItaccolS-D57N	pUCNot, mis sisaldab lacItac-colS-D57N ekspressioonikasseti (Amp ^r)	käesolev töö
pUCNot/lacItaccolS-E96Q	pUCNot, mis sisaldab lacItac-colS-E96Q ekspressioonikasseti (Amp ^r)	käesolev töö
pUCNot/lacItaccolS-E126Q	pUCNot, mis sisaldab lacItac-colS-E126Q ekspressioonikasseti (Amp ^r)	käesolev töö
pUCNot/lacItaccolS-E129Q	pUCNot, mis sisaldab lacItac-colS-E129Q ekspressioonikasseti (Amp ^r)	käesolev töö
pUCNot/lacItaccolS-E126QE129Q	pUCNot, mis sisaldab lacItac-colS-E126QE129Q ekspressioonikasseti (Amp ^r)	käesolev töö
pBK-miniTn7-ΩSm	Streptomütsiiniresistentsust kodeerivat minitransposooni sisaldav plasmiid (Amp ^r Sm ^r)	(Koch jt., 2001)
pminiTn7lacItac-colS	pBK-miniTn7-ΩSm, mis sisaldab minitransposooni koosseisus lacItac-colS ekspressioonikasseti (Amp ^r Sm ^r)	käesolev töö
pminiTn7lacItac-colS-E38Q	pBK-miniTn7-ΩSm, mis sisaldab minitransposooni koosseisus lacItac-colS-E38Q ekspressioonikasseti (Amp ^r Sm ^r)	käesolev töö
pminiTn7lacItac-colS-D57N	pBK-miniTn7-ΩSm, mis sisaldab minitransposooni koosseisus lacItac-colS-D57N ekspressioonikasseti (Amp ^r Sm ^r)	käesolev töö
pminiTn7lacItac-colS-E96Q	pBK-miniTn7-ΩSm, mis sisaldab minitransposooni koosseisus lacItac-colS-E96Q ekspressioonikasseti (Amp ^r Sm ^r)	käesolev töö
pminiTn7lacItac-colS-E126Q	pBK-miniTn7-ΩSm, mis sisaldab minitransposooni koosseisus lacItac-colS-E126Q ekspressioonikasseti (Amp ^r Sm ^r)	käesolev töö
pminiTn7lacItac-colS-E129Q	pBK-miniTn7-ΩSm, mis sisaldab minitransposooni koosseisus lacItac-colS-129Q ekspressioonikasseti (Amp ^r Sm ^r)	käesolev töö
pminiTn7lacItac-colS-E126QE129Q	pBK-miniTn7-ΩSm, mis sisaldab minitransposooni koosseisus lacItac-colS-E126QE129Q ekspressioonikasseti (Amp ^r Sm ^r)	käesolev töö
pUXBF13	Abiplasmiid, mis kodeerib Tn7 transpositsiooniks vajalikke valke (Amp ^r mob ⁺)	(Bao jt., 1991)
pEMG	Suitsiidplasmiid deletsioonitüvede tegemiseks, sisaldab I-SceI endonukleaasi lõikesaiti (Km ^r)	(Martinez-Garcia ja de Lorenzo, 2011)
pEMG/Δ35-33	ΔPP0035-PP0033 lookust sisaldav plasmiid (Km ^r)	käesolev töö
pEMG/Δ903-905	ΔPP0903-PP0905 lookust sisaldav plasmiid (Km ^r)	käesolev töö
pEMG/Δ2579	ΔPP2579 lookust sisaldav plasmiid (Km ^r)	käesolev töö
pSW (I-SceI)	I-SceI endonukleaasi kodeeriv plasmiid deletsioonitüvede tegemiseks (Bp ^r)	(Wong ja Mekalanos, 2000)

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Kadi Ainsaar
(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: 20.08.1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Pseudomonas putida ColRS süsteem on tsingi-, raua-, mangaani- ja kaadmiumiliiga
tunnetav signaalirada,
(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on Rita Hõrak,
(*juhendaja nimi*)

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **27.05.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2013 (*kuupäev*)